



Diversité génétique et recherche de facteurs de virulence de *Nosema ceranae*, parasite de l'abeille mellifère

Mathieu Roudel

► To cite this version:

Mathieu Roudel. Diversité génétique et recherche de facteurs de virulence de *Nosema ceranae*, parasite de l'abeille mellifère. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2013. Français. NNT : 2013CLF22414 . tel-00959521

HAL Id: tel-00959521

<https://theses.hal.science/tel-00959521>

Submitted on 14 Mar 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre 620

Thèse

Présentée publiquement à Clermont -Ferrand
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

SPÉCIALITÉ : Physiologie et Génétique Moléculaires

le 12 décembre 2013 par

Mathieu ROUDEL

**Diversité génétique et recherche de facteurs
de virulence de *Nosema ceranae*,
parasite de l'abeille mellifère**

Devant la commission d'examen composée de :

| | | | |
|-----------------------------|---------------------|---|---------|
| <i>Rapporteurs:</i> | M. Mariano HIGES | DR, Centro Apicola regional de Castilla - La Mancha | Espagne |
| | M. Eric VISCOGLIOSI | DR, CNRS, Université Lille Nord de France | France |
| <i>Examineurs:</i> | M. Jean-Luc BAILLY | MCU, Université d'Auvergne Clermont-Ferrand I | France |
| <i>Directeur de thèse :</i> | M. Nicolas BLOT | MCU, Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand II | France |

Résumé

Le parasite microsporidien *Nosema ceranae* est un pathogène émergent de l'abeille européenne (*Apis mellifera*). Il provoque une maladie appelée nosémose qui peut induire de fortes mortalités dans les colonies. La présence de *N. ceranae* dans les ruches n'est pas toutefois pas systématiquement associée à des symptômes ou à une dépopulation, ce qui suggère une variabilité de sa virulence. Une hypothèse proposée pour expliquer cette variation repose sur l'existence potentielle de variants parasitaires de niveaux de virulence différents. Ce travail a eu pour objectif d'évaluer le polymorphisme de *N. ceranae* par une approche *multilocus*, dans le but de savoir s'il est possible de différencier des isolats parasitaires. La diversité nucléotidique de dix marqueurs génétiques a été évaluée dans des abeilles géographiquement éloignées. L'analyse du polymorphisme de ces gènes a révélé un fort contenu allélique au sein même d'un individu hôte mais une absence de divergence entre les populations parasitaires issues d'hôtes distincts. Ces données montrent que cette approche *multilocus* ne permet pas de différencier des isolats de *N. ceranae*, mais que des populations parasitaires similaires infectent des abeilles géographiquement distantes. Ces données sont en accord avec l'hypothèse d'une colonisation récente d'*A. mellifera* par *N. ceranae* mais posent de nombreuses questions quand à l'origine de la diversité parasitaire au sein d'un seul individu. Le second volet de cette thèse a eu pour objectif de rechercher dans le génome de *N. ceranae* des gènes codant de potentiels facteurs de virulence puis de produire des protéines recombinantes et des anticorps dirigés contre ces facteurs. Ces anticorps devaient permettre de localiser ces protéines d'intérêt au niveau subcellulaire dans des tissus infectés.

Mots-clefs : *Apis mellifera*, Microsporidie, *Nosema ceranae*, diversité génétique, facteurs de virulence

Abstract

The microsporidian parasite *Nosema ceranae* is an emergent pathogen of the Western honeybee (*Apis mellifera*). It is associated to a disease called nosemosis that can lead to high mortality of honybees in colonies. Its presence in hives has not been systematically linked to symptoms or depopulation, suggesting a variation in its virulence. Thus, the existence of several *N. ceranae* variants with different virulence levels has been proposed. In this work aimed to assess *N. ceranae* polymorphism through a *multilocus* approach to test whether is it possible to discriminate between parasite taxa. Thus the nucleotide diversity of ten marker genes has been measured in parasite populations isolated from single *A. mellifera* individuals in distant locations. While high nucleotide diversity and allele content have been observed for all genes in single individuals, the absence of isolate differentiation precluded any taxa discrimination. These data support the hypothesis of a recent host-jump to *A. mellifera* and suggest that similar populations of parasites infect honeybees in distant locations. However they question the origin of such polymorphism within one host. In the second part of this work genes encoding putative virulence factors have been searched within *N. ceranae* genome, in order to produce recombinant proteins and then specific antibodies. Such antibodies would allow the subcellular localization of those proteins in infected tissues.

Keywords: *Apis mellifera*, Microsporidia, *Nosema ceranae*, genetic diversity, virulence factors

*« Bonjour, lecteur.
Vous me voyez.
Je vous vois aussi.
Vous avez un visage lisse aux yeux humides.
Et moi, je vous présente ces pages de papier
recouvertes de petits caractères qui forment ma figure pâle.
Notre contact s'est aussi établi au niveau de la couverture. »*

-- Bernard Werber, Le Livre Du Voyage --

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury : Mariano Higes et Eric Viscogliosi pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Jean-Luc Bailly, de bien avoir accepté le rôle d'examineur.

Mes plus sincères et chaleureux remerciements vont tout naturellement à Nicolas Blot, mon directeur de thèse. Durant ces trois années, son incroyable disponibilité, son travail, son efficacité, sa bonne humeur et ses encouragements ont été pour beaucoup dans l'aboutissement de ce projet. Merci pour la confiance dont tu as fait preuve en me donnant la possibilité de réaliser cette thèse, mais aussi pour ta gentillesse, et tout le temps que tu as su m'accorder. Gérer deux étudiants en thèse sur la même période, juste après avoir acquis ton HDR, est un vrai challenge, que tu as su relever avec brio. Je suis fier d'avoir été l'un de ces premiers doctorants.

Un grand merci également à Frédéric Delbac, responsable de l'équipe Interactions Hôtes-Parasites, et directeur adjoint du LMGE, de m'avoir accepté au sein de son équipe, pour l'intérêt qu'il a porté à ce sujet de thèse, et son implication dans la relecture de ce manuscrit. Merci aussi pour notre grande discussion autour de cette bouteille de vodka typique de l'Ukraine, arrivée peut-être un peu tardivement, mais qui m'a fait prendre conscience de la personne que tu es, et à qui je souhaite le meilleur pour la suite.

Mes remerciements vont aussi à Olivier Gonçalves, qui, au travers de l'encadrement de mes deux stages de Master, a su attiser en moi cette flamme de curiosité qui me pousse à toujours vouloir chercher plus loin. Son encadrement restera le souvenir le plus marquant de toutes mes années d'études. Je tiens aussi à le remercier fortement pour le soutien dont il a fait preuve lors de ma candidature sur ce projet de thèse, jamais personne n'avait porté sur moi un regard aussi positif et je garderai toujours une part de fierté de la période où nous avons travaillé ensemble.

Un grand Merci à Julie, Muriel, Pierre et William. Votre amitié, votre soutien et tous les bons moments passés ensemble ont été les piliers qui m'ont permis d'arriver au bout de ce travail de thèse. Je pense que peu de doctorants ont la chance d'avoir un groupe d'amis aussi

proche, autant au niveau géographique que sur le plan affectif, et je garderai précieusement en mémoire tous ces petits moments. Evidemment, je parle au passé en ce qui concerne cette thèse, mais nous rédigerons à plusieurs le futur de ces lignes.

Enfin je tiens à dédicacer cette thèse à tout mon entourage, que ce soit ma famille, mes amis ou mon amour. Ma vie ne serait pas ce qu'elle est si toutes ces personnes n'avaient pas été là, et, même s'ils n'ont pas participé directement à la réalisation de ce travail, ils ont participé à la construction de la personne que je suis maintenant, et pour cela, je les en remercie.

« Nous ne sommes que des grains de sable mais nous sommes ensemble. Nous sommes comme les grains de sable sur la plage, mais sans les grains de sable la plage n'existerait pas. »

-- Bernard Werber, Les Thanatonautes--

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Résumé | 1 |
| Abstract..... | 1 |
| Remerciements | 3 |
| Liste des figures..... | 8 |
| Liste des figures..... | 9 |
| Liste des tableaux | 10 |
| Introduction | 12 |
| I- Le déclin des abeilles mellifères..... | 17 |
| I.A. Importance écologique et économique des abeilles | 17 |
| I.A.1. D'importants pollinisateurs..... | 17 |
| I.A.2. Importance économique | 18 |
| I.B. Les pertes de colonies..... | 19 |
| I.B.1. Des pertes de colonies à l'échelle mondiale..... | 19 |
| I.B.2. Le syndrome d'effondrement des colonies (CCD)..... | 19 |
| I.B.3. Origine multi-causale du déclin des colonies d'abeilles | 20 |
| I.B.3.1. Facteurs environnementaux | 20 |
| I.B.3.2. Diversité génétique de l'abeille | 22 |
| I.B.3.3 Pathogènes..... | 23 |
| II- <i>Nosema ceranae</i>, une microsporidie des abeilles..... | 26 |
| II.A. <i>Nosema ceranae</i> , un parasite microsporidien..... | 26 |
| II.A.1. Généralités sur les microsporidies..... | 26 |
| II.A.2 Une affiliation phylogénétique controversée..... | 27 |
| II.A.3. Un phylum fortement diversifié | 28 |
| II.B. <i>Nosema ceranae</i> : une microsporidie de l'abeille..... | 30 |
| II.B.1 Découverte de <i>Nosema ceranae</i> | 30 |
| II.B.2. Hypothèse du saut d'espèce, spectre d'hôte et répartition géographique..... | 31 |
| II.B.3. Nosémoses des abeilles | 31 |
| II.B.3.1. Nosémose de type A..... | 32 |
| II.B.3.2. Nosémose de type C | 32 |
| II.B.3.3. Prévalence | 32 |
| II.C. Cycle de vie de <i>Nosema ceranae</i> | 33 |
| II.C.1. Voies de transmission..... | 33 |
| II.C.1.1. Transmission entre individus au sein de la colonie..... | 33 |
| II.C.1.2. Transmission entre colonies | 34 |
| II.C.2. La spore..... | 34 |
| II.C.2.1. Généralité | 34 |

| | |
|---|-----------|
| II.C.2.2. La paroi sporale..... | 35 |
| II.C.3. Invasion..... | 36 |
| II.C.3.1. Appareil invasif..... | 36 |
| II.C.3.2. L'élément infectieux : le sporoplasme..... | 38 |
| II.C.3.3. Germination sporale et internalisation du parasite..... | 38 |
| II.C.4. Multiplication intracellulaire et prolifération..... | 39 |
| II.C.4.1. La mérogonie..... | 39 |
| II.C.4.2. La sporogonie..... | 39 |
| II.C.4.3. Prolifération sporale..... | 40 |
| II.D. Caractéristiques d'une infection par <i>N. ceranae</i> | 40 |
| II.D.1. Diagnostic..... | 41 |
| II.D.1.1. Microscopie..... | 41 |
| II.D.1.2. Biologie moléculaire..... | 41 |
| II.D.2. Atteinte à l'échelle individuelle..... | 41 |
| II.D.3. Thérapie..... | 42 |
| II.E. Rôle incertain dans les effondrements de colonies..... | 42 |
| III- Génomique chez les microsporidies..... | 44 |
| III.A. Les gènes codant les ARN ribosomiaux..... | 44 |
| III.A.1. Caractéristiques des ADNr chez les microsporidies..... | 44 |
| III.A.1.1. Organisation variable des unités transcriptionnelles..... | 45 |
| III.A.1.2. Multiplicité des loci des ADNr..... | 46 |
| III.A.2. Génomique chez les microsporidies..... | 46 |
| III.A.3. Génomique chez <i>Nosema ceranae</i> | 47 |
| III.B. Les gènes codants des protéines..... | 49 |
| III.B.1. Les protéines de la paroi sporale (EnPs, SWPs)..... | 50 |
| III.B.2. Les protéines du tube polaire (PTPs)..... | 50 |
| III.C. Discussion sur les études de génomique chez <i>N. ceranae</i> | 52 |
| IV- Polymorphisme génétique de <i>Nosema ceranae</i> : une approche <i>multilocus</i>..... | 55 |
| IV.A. Matériels et Méthodes..... | 56 |
| IV.A.1. Matériel biologique..... | 56 |
| IV.A.2. Analyses de séquences protéiques..... | 57 |
| IV.A.3. Extraction d'ARN et RT-PCR..... | 57 |
| IV.A.4. Amplification et clonage des marqueurs..... | 57 |
| IV.A.5. Séquençage et édition des séquences..... | 58 |
| IV.A.6. Analyses statistiques..... | 58 |
| IV.A.7. Modélisations..... | 60 |
| IV.B. Résultats..... | 62 |
| IV.B.1. Sélection des marqueurs..... | 62 |
| IV.B.2. Polymorphisme intra- et inter-isolats des marqueurs..... | 63 |

| | |
|---|------------|
| IV.B.3. Nature des caractères polymorphiques | 64 |
| IV.C. Discussion | 66 |
| IV.C.1. Une absence de divergence malgré la diversité de <i>N. ceranae</i> | 66 |
| IV.C.1.1. La diversité nucléotidique des gènes de <i>N. ceranae</i> | 66 |
| IV.C.1.2. L'absence de divergence entre isolats empêche leur discrimination | 67 |
| IV.C.1.3. Indices sur l'évolution de <i>N. ceranae</i> chez <i>A. mellifera</i> | 68 |
| IV.C.2. Localisation cellulaire de la diversité chez <i>N. ceranae</i> | 69 |
| IV.C.2.1. Une co-infection par de multiples variants semble improbable | 69 |
| IV.C.2.2. La méconnaissance de la ploïdie de <i>N. ceranae</i> | 70 |
| IV.C.3. Origine et maintenance de la diversité chez <i>N. ceranae</i> | 71 |
| IV.C.3.1. Indices de l'existence d'événements de recombinaison | 71 |
| IV.C.3.2. Sexualité chez <i>N. ceranae</i> et les microsporidies | 71 |
| IV.C.3.3. Mutations et mécanismes de réparation de l'ADN | 73 |
| IV.D. Conclusion | 74 |
| V- Recherche de facteurs de virulence et localisation subcellulaire de protéines de <i>N. ceranae</i> .. | 75 |
| V.A. Matériel et Méthodes | 77 |
| V.A.1. Construction des plasmides recombinants | 77 |
| V.A.1.1. Insertion en vecteurs de clonage | 77 |
| V.A.1.2. Construction de vecteurs d'expression | 77 |
| V.A.2. Production de protéines recombinantes | 78 |
| V.A.2.1. Production de protéines recombinantes chez <i>Escherichia coli</i> | 78 |
| V.A.2.2. Séparation des protéines par SDS-PAGE | 78 |
| V.A.2.3. Purification de protéines portant une étiquette histidine | 78 |
| V.A.3. Production d'anticorps et immunodétection de protéines | 79 |
| V.A.3.1. Production d'anticorps | 79 |
| V.A.3.2. Immunodétection par WesternBlot | 79 |
| V.A.3.3. Détection par immunofluorescence | 80 |
| V.B. Résultats / Discussion | 81 |
| V.B.1. Recherche de gènes potentiellement impliqués dans la pathogénie de <i>N. ceranae</i> | 81 |
| V.B.1.1. Gènes structuraux de la spore | 81 |
| V.B.1.2. Gènes codant des protéines portant des domaines d'intérêts | 81 |
| V.B.2. Clonages | 83 |
| V.B.3. Production de protéines de fusion | 83 |
| V.B.4. Production d'anticorps | 84 |
| V.C. Conclusion | 86 |
| VI- Conclusion générale | 88 |
| Références bibliographiques | 92 |
| Annexes | 107 |

-
- Figure 1:** Différentes espèces d'hyménoptères.
- Figure 2:** Les poils de l'abeille (*Apis mellifera*).
- Figure 3:** Répartition d'*Apis mellifera*.
- Figure 4:** Pourcentage de colonies perdues lors de l'hiver 2007-2008 dans différents pays.
- Figure 5:** Interactions entre différents acteurs de la perte des colonies d'abeilles.
- Figure 6:** Cladogramme d'espèces du genre *Apis* construit sur les caractéristiques du comportement sexuel.
- Figure 7:** Distribution mondiale des virus ABPV, IAPV et KBV.
- Figure 8:** Pertes mondiales de colonies d'abeilles dues à *Varroa destructor* rapportées en 2009.
- Figure 9:** Les acariens parasites de l'abeille
- Figure 10:** Schéma représentatif d'une spore de microsporidie
- Figure 11:** Historique de la position taxonomique des microsporidies.
- Figure 12 :** Arbre phylogénétique basé sur la protéine SRP54.
- Figure 13 :** Photographies en microscopie électronique à transmission de coupes transversales de spores de *Nosema ceranae* (A) et de *Nosema apis* (B).
- Figure 14:** Distribution géographique de *N. ceranae* et *N. apis*.
- Figure 15:** Schéma des différentes hypothèses d'entrée du matériel infectieux dans une cellule-hôte.
- Figure 16:** Schéma du cycle de vie de *N. ceranae* dans une cellule intestinale.
- Figure 17:** Effets de la combinaison *N. ceranae* - fipronil sur la survie d'abeilles.
- Figure 18:** Structures secondaires des ARNr des grandes sous unités ribosomiques de *Saccharomyces cerevisiae* et *Nosema apis*.
- Figure 19:** Locus ADNr chez *Saccharomyces cerevisiae* et trois espèces microsporidiennes du genre *Nosema* : *N. apis*, *N. bombycis* et *N. ceranae*.
- Figure 20:** Alignement des séquences de l'ITS d'isolats de *N. ceranae*, *N. apis* et *N. bombi*
- Figure 21:** Alignement des séquences partielles du SSUrDNA de *Nosema ceranae*.
- Figure 22:** Réseau d'haplotypes du SSUrDNA d'isolats de *Nosema* spp. provenant de différentes espèces de bourdons (genre *Bombus*) prélevés en Chine
- Figure 23:** Arbre phylogénétique basé sur la séquence partielle du SSUrDNA de *N. ceranae* isolés de deux espèces d'abeilles, *A. mellifera* et *A. cerana*.
- Figure 24:** Génotypage d'isolats d'*E. hellem* par analyse sur gel d'agarose des produits d'amplifications par PCR d'un fragment du gène ptp1.
- Figure 25:** Arbre phylogénétique des séquences du gène ptp1 d'isolats de *N. ceranae* provenant de différents hôtes.

Figure 26: Recherche de domaines répétés à l'aide du logiciel MEME dans les séquences codées par NCER_100533, NCER_101600 et NCER_100070.

Figure 27: Détection de transcrits par RT-PCR.

Figure 28: Diversité nucléotidique de 10 séquences codantes de *N. ceranae*.

Figure 29: Arbres phylogénétiques des séquences des gènes codant le SSUrDNA et EnP1B.

Figure 30: Réseau des haplotypes des gènes NCER_101165 et NCER_101600.

Figure 31: Logo des motifs répétés de EnP1B et NCER_101600.

Figure 32: Alignement partiel et centré sur les motifs répétés des séquences protéiques de EnP1B des différents isolats.

Figure 33: Modèle de structure secondaire de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique de *N. ceranae*.

Figure 34: Hypothèse évolutive du passage de *N. ceranae* chez *A. mellifera*.

Figure 35: Loci microsporidiens liés à la détermination sexuelle chez les champignons.

Figure 36 : Production d'anticorps contre *Nosema ceranae*.

Figure 37 : Stratégie expérimentale pour la production de protéines de fusion.

Figure 38 : Expression en système pGEX.

Figure 39 : Expression en système pET.

Figure 40 : Expression de la protéine de fusion His•Tag-NCER_101165 dans la souche d'*E. coli* BL21 star (DE3), cultivée et maintenue à 30°C ou à 37°C.

Figure 41: Purification de la protéine de fusion His•Tag-NCER_101165 par chromatographie d'affinité.

Figure 42 : Essais de solubilisation de la protéine de fusion NCER_101165.

Figure 43: Gel préparatif de séparation du culot contenant la protéine de fusion NCER_101165.

Figure 44: Immunodétection des protéines reconnues par l'antisérum anti- NCER_101165.

Figure 45: Immunolocalisation de la protéine NCER_101165 dans des intestins d'abeilles infectées par *N. ceranae*.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les maladies et ravageurs les plus communs de l'abeille.

Tableau 2 : Origine des abeilles utilisées dans ce travail.

Tableau 3 : Gènes marqueurs choisis et amorces utilisées lors des amplifications PCR et des RT-PCR.

Tableau 4 : Caractéristiques et statistiques des distances génétiques des séquences des 10 marqueurs génétiques de *N. ceranae*.

Tableau 5 : Statistiques des tests sur la sélection et l'évolution des populations des séquences des 10 marqueurs génétiques de *N. ceranae*.

Tableau 6 : Distribution de gènes associés à la méiose chez des eucaryotes.

Tableau 7 : Identifiants des protéines d'*E. cuniculi* et *N. ceranae* homologues à celles impliquées dans les voies de réparations chez *S. cerevisiae* selon Gill et Fast (2007).

Tableau 8 : Cadres de lecture choisis et amorces utilisées lors des amplifications en vue des clonages en vecteur d'expression

Tableau 9 : Gènes sélectionnés pour leur clonage.

Tableau 10 : Résultats des clonages.

Tableau 11 : Expression de gènes recombinants chez *Escherichia coli*.

INTRODUCTION

*« Entre ce que je pense, ce que je veux dire, ce que je crois dire, ce que je dis,
ce que vous avez envie d'entendre, ce que vous croyez entendre,
ce que vous entendez, ce que vous avez envie de comprendre,
ce que vous croyez comprendre, ce que vous comprenez.
Il y a 10 possibilités d'avoir des difficultés à communiquer.
Mais essayons quand même.... »*

-- Bernard Werber, Encyclopédie du savoir relatif et absolu, Tentative –

Introduction

Depuis plus de 8000 ans, l'Homme n'a cessé de chercher l'origine des maladies qui affaiblissent son corps, détruisent ses plantations ou déciment ses cheptels. Il ne se doutait pas que les responsables se regroupaient en une multitude de microorganismes littéralement invisibles à l'œil nu. Il n'imaginait pas non plus que le gonflement de son pain sous l'effet de la chaleur ou que la présence de bulles dans sa bière étaient des phénomènes provoqués par un dégagement gazeux dû à l'activité de ces mêmes êtres microscopiques. Ce n'est que depuis l'invention du microscope au XVII^{ème} siècle que l'Homme a pu se rendre compte qu'il vivait entouré d'infimes organismes dont les rôles sont aussi nombreux que variés. Parmi la multitude d'interaction entre les organismes, macro- ou microscopiques, le parasitisme est rapidement devenu un sujet d'étude fascinant. En effet, lorsque les scientifiques ont compris que de petits organismes étaient capables de causer de sérieux dégâts sur la santé de l'homme, ils se sont attachés à vouloir comprendre ces phénomènes.

Si le parasitisme peut se définir comme une relation entre deux espèces dans laquelle l'une, le parasite, tire profit de l'autre pour sa survie, le *phylum Microsporidia* regroupe des eucaryotes unicellulaires qui ont poussé ce principe à l'extrême. Les microsporidies sont des parasites intracellulaires obligatoires qui ont perdu, au cours de leur évolution, nombre de fonctions métaboliques pour lesquelles ils dépendent de leur hôte. Elles sont capables, comme l'indique leur nom, de former des spores, stade de résistance et de dissémination dans l'environnement. Leur adaptation au parasitisme intracellulaire est en outre caractérisée par une structure originale : le tube polaire, qui permet d'injecter le matériel infectieux de la spore dans la cellule-hôte. Un temps considérées comme des eucaryotes primitifs, les microsporidies sont désormais classées parmi les champignons. Elles infectent de nombreux animaux, dont l'homme. Elles provoquent parfois des maladies et sont souvent considérées comme opportunistes.

L'abeille mellifère (*Apis mellifera*), dont on constate un déclin des populations dans le monde, est infectée par deux microsporidies, dont une émergente et fréquemment rencontrée dans les colonies, *Nosema ceranae*. Son impact sur les colonies d'abeilles est controversé, suggérant l'existence de variants dont l'effet délétère pour l'hôte différerait. Afin de tester cette hypothèse, il est nécessaire de pouvoir différencier des souches parasitaires. Le

polymorphisme nucléotidique de plusieurs gènes de *N. ceranae* a été comparé entre des isolats provenant de quatre régions géographiquement éloignées. Ce travail sera présenté, en expliquant pourquoi la diversité observée empêche le génotypage et en posant quelques hypothèses sur l'origine et la maintenance de cette diversité.

Le second volet de cette thèse a eu pour but de rechercher des facteurs de virulence du parasite et de les localiser, au niveau subcellulaire, lors d'une infection chez *A. mellifera*. Les connaissances sur la pathogénie de *N. ceranae* manquent en effet pour comprendre son développement et ses interactions avec l'hôte, et pour envisager ensuite d'identifier des moyens de lutte permettant d'enrayer son développement et sa propagation. Le séquençage du génome de *N. ceranae* a permis de rechercher des gènes codant des protéines portant des domaines d'intérêts, qui pourraient jouer un rôle dans le développement du parasite. En revanche, le manque de temps ne m'a pas permis de compléter autant que je le voulais cet aspect du travail de thèse, même si sa finalisation ne semble pas lointaine.

Ces travaux ont donné lieu aux communications suivantes :

❖ **Articles**

Roudel M., Aufauvre J., Delbac F., Blot N. (2013)

New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on a *multilocus* sequence analysis. *Parasitology*, **140**:1346-1356.

Roudel M., Blot N. (2012)

Etude du polymorphisme génétique du parasite microsporidien *Nosema ceranae*. *Auvergne Sciences, Le Magazine*. 02 août.

Aufauvre J., Biron D. G., Vidau C., Fontbonne R., **Roudel M.**, Diogon M., Viguès, B., Belzunces L. P., Delbac F., Blot N. (2012)

Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honey bee. *Scientific Reports*, **2**: 326

❖ **Communications orales**

Roudel M., Aufauvre J., Delbac F., Blot N.

New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on a *multilocus* sequence analysis. *XXXXIII International Apimondia Congress*. Kiev, Ukraine. 29 septembre - 4 octobre 2013.

Roudel M., Blot N.

Etude du polymorphisme génétique du parasite microsporidien *Nosema ceranae*. *Journée des doctorants du LMGE*. 7 décembre 2012, Clermont-Ferrand.

Roudel M., Aufauvre J., Delbac F., Blot N.

Etude du polymorphisme génétique de *Nosema ceranae*, un parasite de l'abeille mellifère. *Journée Scientifique Apicole*. Nantes. 7 juin 2012.

❖ **Posters**

Roudel M., Aufauvre J., Delbac F., Blot N.

Etude du polymorphisme génétique de *Nosema ceranae*, un parasite de l'abeille mellifère. *Journée Scientifique Apicole*. 11 octobre 2013, Aix-Les-Bains.

Roudel M., Aufauvre J., Delbac F., Blot N.

Etude du polymorphisme génétique de *Nosema ceranae*, un parasite de l'abeille mellifère. *Journées de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, Agronomie et Environnement*. 16-17 mai 2013, Clermont-Ferrand.

Prix du meilleur poster.

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

*« Il faut accepter de planter
pour que d'autres récoltent
ailleurs et plus tard. »*

-- Bernard Werber, La Révolution des Fourmis--



Figure 1 : Différentes espèces d'hyménoptères. Sur la première ligne sont représentées trois superfamilles d'hyménoptères avec, de gauche à droite, les Formicidea, les Apoidea et les Vespidea. La seconde ligne rassemble trois genres d'Apoidea : *Bombus* à gauche, *Apis* au milieu et *Xylocopa* à droite. La dernière ligne regroupe trois espèces d'abeilles mellifères : *Apis cerana* à gauche, *Apis florea* au milieu et *Apis dorsata* à droite. *Apis mellifera* apparaît sur la photographie centrale.

I- Le déclin des abeilles mellifères

Depuis au moins deux décennies, une réduction de l'abondance des pollinisateurs, notamment des abeilles mellifères, est observée dans le monde entier (Natural Research Council, 2006). Ce déclin est également associé à celui d'espèces végétales (Biesmeijer *et al.*, 2006). En effet, 84% de la production des espèces cultivées en Europe (Williams, 1994) et plus de 70% des récoltes à la base de l'alimentation humaine sont dépendantes des pollinisateurs (Klein *et al.*, 2007). Parmi ces espèces, le pollinisateur domestique qui soutient le plus la production agricole est l'abeille européenne *Apis mellifera* (**Figure 1**).

I.A. Importance écologique et économique des abeilles

Le terme « abeille » est le nom vernaculaire donné aux espèces appartenant à la superfamille des Apoidea, au sein du vaste ordre des Hyménoptères, qui comprend aussi, entre autres, les guêpes (Vespidea) et les fourmis (Formicidea) (**Figure 1**). Plus de 20 000 espèces d'abeilles sont répertoriées dans le monde, dont 2 500 en Europe et environ un millier en France. Parmi les Apoidea, les abeilles mellifères, seules capables de produire et stocker le miel, sont regroupées dans deux tribus distinctes (Apini et Meliponini) de la sous-famille des Apinae, qui comprend également d'autres tribus comme les bourdons (Bombini). Parmi les abeilles mellifères peuvent être citées l'abeille géante *Apis dorsata*, l'abeille naine *Apis florea* et l'abeille asiatique *Apis cerana*, toutes les trois rencontrées en Asie (parfois en Australie), et l'abeille européenne *Apis mellifera* (**Figure 1**), de répartition mondiale et qui est l'espèce presque exclusivement utilisée en apiculture de nos jours. Ces abeilles se nourrissent de miel et de pain de pollen obtenus par modifications du nectar et du pollen récupérés lors du butinage. De par cette activité de butinage, elles participent activement à la pollinisation des plantes à fleurs.

I.A.1. D'importants pollinisateurs

Le recours à des animaux pour assurer la pollinisation constitue une caractéristique majeure des angiospermes. Les fleurs attirent ces visiteurs principalement avec du nectar et du pollen mais aussi *via* leur morphologie, leurs couleurs vives et leur parfum. Certaines plantes sont pollinisées par des oiseaux, des marsupiaux ou des rongeurs, mais ce sont de loin les insectes, et plus particulièrement les abeilles, qui occupent une place prépondérante dans la



Figure 2 : Les poils de l'abeille (*Apis mellifera*). Le pollen des fleurs est capturé par la multitude de poils présents sur le corps de l'abeille, permettant la pollinisation. (Source : <http://www.pollinis.org>)

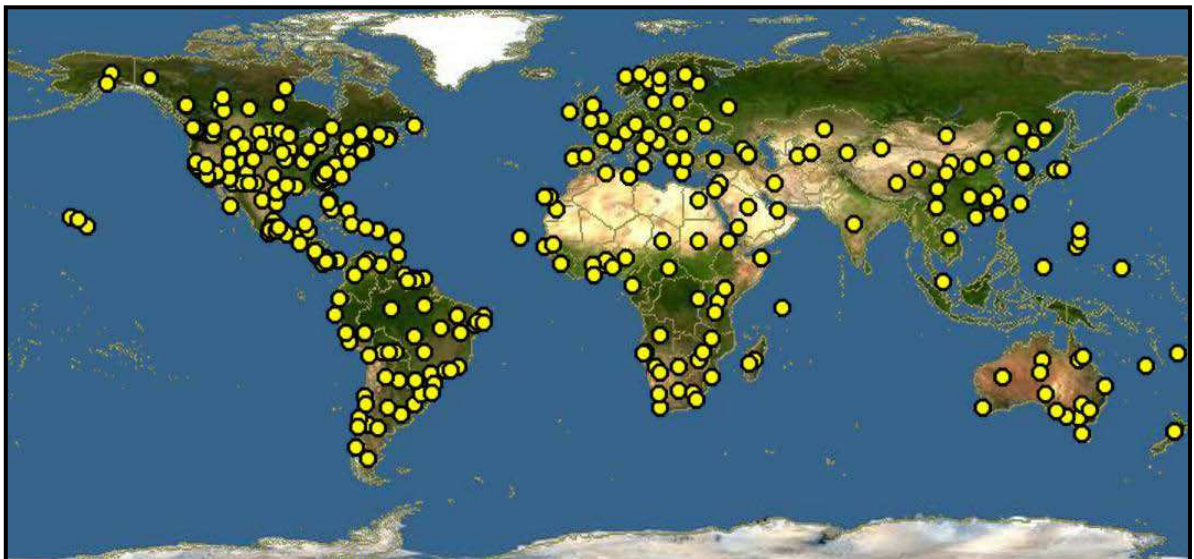


Figure 3 : Répartition d'*Apis mellifera*. L'espèce *Apis mellifera* regroupe plus de 20 sous-espèces différentes, et se retrouve dans la quasi-totalité des régions du monde, mis à part les régions froides (grand nord) et les déserts secs (Sahara). Les points jaunes indiquent les régions dans lesquelles la présence d'une sous-espèce a été démontrée.

pollinisation. Sans insectes pollinisateurs, la fécondation des plantes devient essentiellement une auto-fécondation, qui induit un appauvrissement du patrimoine génétique, ou une fécondation anémophile, peu efficace, notamment entre individus éloignés.

Le rôle des abeilles apparaît comme primordial dans le maintien de la biodiversité de nombreux écosystèmes. Leur morphologie leur permet d'être d'excellents pollinisateurs, notamment grâce à leurs poils nombreux et relativement longs (**Figure 2**) qui permettent une bonne fixation et un bon transport du pollen d'une fleur à l'autre (Bradbear, 2010). Elles contribuent ainsi à la reproduction de plus de 80% des espèces de plantes, soit plus de 200 000 espèces (Vaissière, 2006). Cette forte prépondérance des abeilles est due à leur large répartition, leur grand nombre et leur comportement alimentaire et social.

Les abeilles mellifères sont présentes partout dans le monde. Si certaines espèces sont localisées dans des régions spécifiques (par ex. *A. cerana*, *A. dorsata* et *A. florea* en Asie), *A. mellifera* est l'espèce dont l'aire de répartition est la plus grande (**Figure 3**) car la plus domestiquée. En sachant qu'en 2007, le nombre de colonies d'abeilles domestiques dans le monde a été estimé à 72.6 millions (FAO, 2009), et qu'une colonie compte entre 20 000 et 80 000 individus, leur « potentiel de pollinisation » est facilement imaginable (Seeley, 1985).

De plus, la capacité des butineuses à communiquer à leurs congénères les sites de ressources abondantes en nectar et pollen les incite à visiter le même site jusqu'à ce qu'elles aient récolté la majorité des ressources disponibles. Ce comportement, appelé "constance à butiner", garantit une pollinisation optimale de la zone (Seeley, 1985). A l'échelle de l'individu, chaque ouvrière fait preuve d'une grande fidélité à l'espèce butinée lors d'un même voyage, ce qui maximise les transferts de pollen entre fleurs d'une même espèce, et augmente ainsi les chances de fécondation (Vaissière, 2006).

I.A.2. Importance économique

Les études portant sur la valeur économique des pollinisateurs ont donné des résultats variés et peu concordants, même si globalement elles tendent toutes à montrer un fort poids des abeilles (et essentiellement *A. mellifera*) dans l'économie mondiale de certaines denrées.

Parmi les 89 espèces végétales cultivées pour l'alimentation humaine, 46 sont dépendantes de la pollinisation, qui serait même indispensable pour 6 d'entre elles (Gallai *et al.*, 2009). La valeur économique de ces 46 espèces s'élèverait à 625 milliards d'euros, soit 39% de la valeur de la production agricole mondiale, dont 153 milliards seraient directement imputables à la pollinisation. De par leur domesticité et leur rendement de pollinisation, les

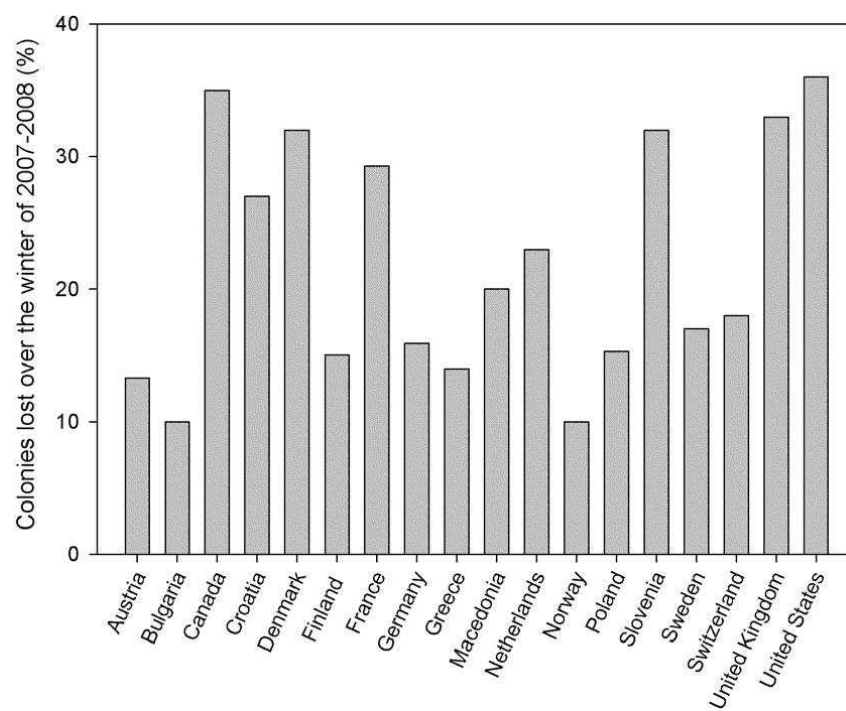


Figure 4 : Pourcentage de colonies perdues lors de l'hiver 2007-2008 dans différents pays.
 (D'après vanEngelsdorp and Meixner, 2010)

abeilles mellifères, *A. mellifera* en tête, jouent un rôle essentiel et sont de plus en plus exploitées. Aux Etats-Unis, dans les régions pauvres en pollinisateurs, des apiculteurs proposent ainsi aux agriculteurs des services de pollinisation par les abeilles, générants des emplois et de nouvelles ressources économiques (Sumner et Boriss, 2006).

Le miel lui-même est une importante denrée, même s'il ne constitue plus, depuis la renaissance, la principale source de sucre concentré. Estimée à 1,07 millions de tonnes en 2007, la production mondiale de miel représenterait environ 1,25 milliards de Dollars US (FAO, 2009).

I.B. Les pertes de colonies

I.B.1. Des pertes de colonies à l'échelle mondiale

Les disparitions d'abeilles ont commencé à faire parler d'elles au début des années 2000, lorsque la majorité des pays industrialisés ont enregistré d'importantes pertes après une saison hivernale. A partir de 2006, les apiculteurs américains ont enregistré des pertes annuelles de 30 à 40% de leurs colonies à la sortie de l'hiver (VanEngelsdorp *et al.*, 2012). La saison hivernale 2007-2008 a aussi vu la disparition de près de 35% des colonies au Canada (**Figure 4**) (Chagnon, 2008). Les pays européens ne sont pas en reste, avec 6 millions de colonies d'abeilles perdues entre 1970 et 2006 sur 21 millions initialement, et avec des pertes relativement importantes lors de l'hiver 2007-2008 (**Figure 4**) (FAO, 2009).

VanEngelsdorp *et al.* (2012) ont publié une étude de surveillance des ruchers aux Etats-Unis, en indiquant les raisons apparentes des pertes subies lors de l'hiver 2010-2011. Les principales causes incriminées ont été les quantités de ressources (famine), des colonies peu peuplées en automne, de mauvaises conditions climatiques hivernales, des reines dites «faibles» (sans argument explicatif) et la présence d'agents pathogènes dans les ruches. Aucun de ces facteurs (ni aucun autre incriminé dans d'autres études, **Cf. I.B.3.**) (Potts *et al.*, 2010), ne permet cependant d'expliquer à lui seul les pertes observées. La communauté scientifique estime aujourd'hui que ces pertes auraient une origine multi-causale.

I.B.2. Le syndrome d'effondrement des colonies (CCD)

Si des pertes d'abeilles sont constatées partout dans le monde, un phénomène particulier a été observé aux Etats-Unis, appelé syndrome d'effondrement des colonies pour Colony Collapse Disorder ou CCD (VanEngelsdorp *et al.*, 2009). Le CCD est caractérisé par un ensemble de symptômes dont la disparition soudaine d'une partie importante (jusqu'à 70-

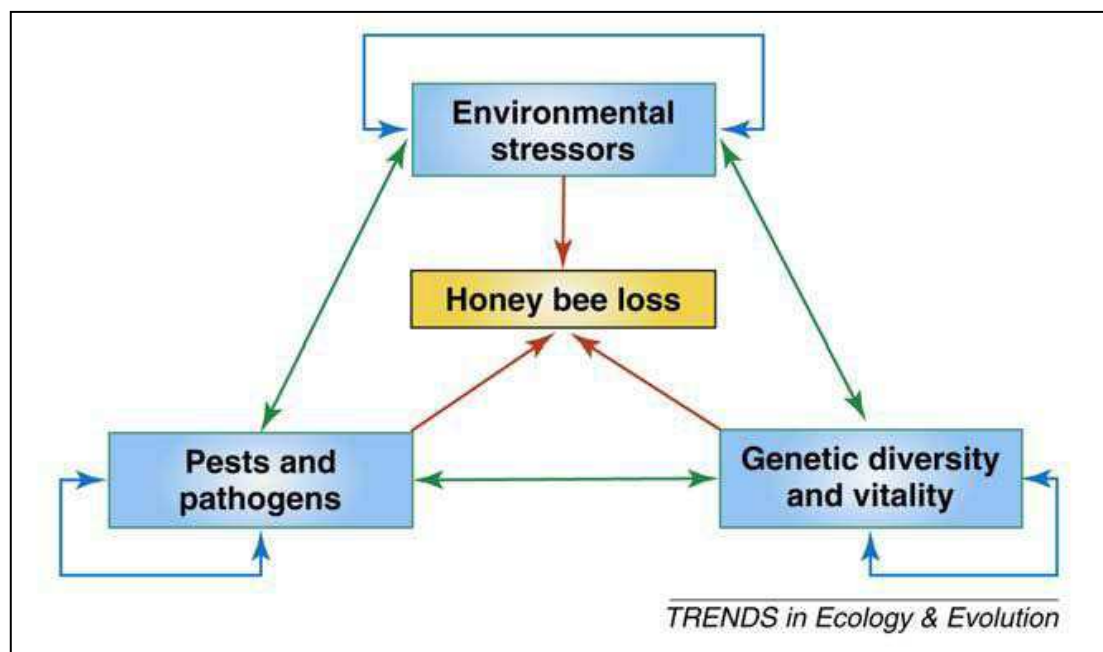


Figure 5 : Interactions entre différents acteurs du déclin des abeilles. Les cadres bleus représentent les trois groupes principaux d'acteurs associés aux pertes, les flèches rouges représentent leur impact direct sur les pertes, les flèches vertes représentent les interactions entre les trois groupes, et les flèches bleues représentent les interactions au sein même de ces groupes. (D'après Potts et al., 2010)

80%) de la population d'ouvrières d'une colonie, ainsi que l'absence de cadavres dans ou à proximité de la ruche. Il reste souvent des stocks de nourriture et, si des abeilles subsistent, leur population est constituée le plus souvent de la reine et d'un nombre restreint de jeunes ouvrières. La disparition de ces ouvrières, lorsqu'elle n'est pas fatale à la colonie, entraîne une baisse importante de la productivité, pouvant elle-même entraîner le déclin de la colonie à court terme, surtout si le CCD intervient au moment de l'hivernage.

Selon certaines sources, ce phénomène connaît un accroissement épidémique depuis au moins les années 1985 (Underwood et vanEngelsdorp, 2007). Cependant, il faut rester vigilant: si le CCD est associé à une disparition d'abeilles, la réciproque n'est pas exacte. Des colonies peuvent s'affaiblir, et voir leur population s'effondrer, sans pour autant répondre à la définition de ce syndrome. Ainsi, en Europe, des pertes de colonies ont été enregistrées depuis plusieurs années sans qu'ait été fait un lien avec le CCD.

I.B.3. Origine multi-causale du déclin des colonies d'abeilles

Les pertes de colonies ne seraient donc caractérisables ni par un unique syndrome ni par une unique cause. Elles auraient une origine multifactorielle (Cox-Foster *et al.*, 2007; Anderson et East, 2008) et il semblerait même que des interactions entre de nombreux facteurs soient l'une des explication les plus probables de ces fortes mortalités (**Figure 5**) (Potts *et al.*, 2010). Ces facteurs peuvent être répartis dans trois catégories principales: les stress environnementaux, la diversité génétique des abeilles, et les espèces pathogènes et invasives.

I.B.3.1. Facteurs environnementaux

Ce sont probablement les facteurs les plus nombreux et les plus variés. Souvent d'origine anthropique, ils agissent directement ou *via* l'intermédiaire des ressources sur la survie et le comportement des abeilles.

a. Modifications des paysages et des ressources

Le remembrement et la réduction des zones sauvages au profit de l'agriculture affectent les abeilles, et les pollinisateurs en général, car ils réduisent la disponibilité et la variété des plantes pouvant combler les exigences nutritionnelles des différents pollinisateurs (Kearn *et al.*, 1997). Le pollen et le nectar sont en effet leurs seules sources alimentaires (Jump et Penuelas, 2006). Si les abeilles mellifères ont un régime alimentaire plus large que

d'autres espèces, elles sont néanmoins affectées par l'altération des ressources. La qualité et la quantité de ressources ont en effet un impact sur la physiologie et l'immunité de l'abeille (Alaux *et al.*, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2013). Ceci est d'autant plus important dans les zones de monocultures, qui présentent des ressources très peu diversifiées et limitées en abondance et dans le temps (famine).

b. Climat

Dans un écosystème, les perturbations climatiques peuvent avoir un impact sur les ressources mais aussi altérer le développement de certaines espèces, ainsi que les interactions entre espèces (Parmesan *et al.*, 2006). Le développement d'*A. mellifera* suivant un cycle saisonnier, un hiver très long aura pour conséquence un épuisement des réserves de nourriture qui risque de mettre en péril la survie de la colonie. Les changements climatiques imputés à l'action de l'homme pourraient donc avoir de graves conséquences.

c. Contaminants agro-environnementaux: les pesticides

De multiples contaminants ont été détectés dans les matrices de la ruche (pollen, cire, miel) et dans les abeilles elles-mêmes (Mullin *et al.*, 2010; Wiest *et al.*, 2011 ; Lambert *et al.*, 2013). Parmi eux, les pesticides font l'objet d'une attention particulière car ils sont suspectés d'être des facteurs importants dans le déclin des colonies. Les pesticides sont conçus dans le but d'éradiquer des ravageurs et ils regroupent diverses molécules herbicides, fongicides ou insecticides. Les pesticides permettraient ainsi de diminuer de 20% les pertes de production dans des cultures intensives (Oerke et Dehne, 2004). Malheureusement, ils peuvent également avoir des effets délétères sur des espèces non cibles comme l'abeille.

20 dernières années, une nouvelle génération d'insecticides a été développée pour éviter les traitements par pulvérisation: les insecticides systémiques, qui sont appliqués sous forme d'enrobage de semences et qui agissent à faible dose. Ceux-ci se retrouvent dans les différents organes de la plante ainsi que dans le pollen et le nectar et peuvent alors atteindre les pollinisateurs. Par exemple, les insecticides neurotoxiques de la famille des néonicotinoïdes, retrouvées dans différentes formulations commerciales (Gaucho[®], Proteus[®], Cruiser[®]...), auraient des effets néfastes sur les abeilles, allant de la désorientation à des surmortalités, en passant par des effets sur la reproduction et le comportement (Aufauvre *et al.*, 2012; Blacquièrre *et al.*, 2012). Il est important de préciser que certains insecticides, qui ciblent l'ectoparasite de l'abeille *Varroa destructor* (Cf. I.B.3.3), sont directement appliqués dans les ruches. Ainsi, l'amitrazé, l'acaricide du traitement Apivar[®], se retrouve dans les

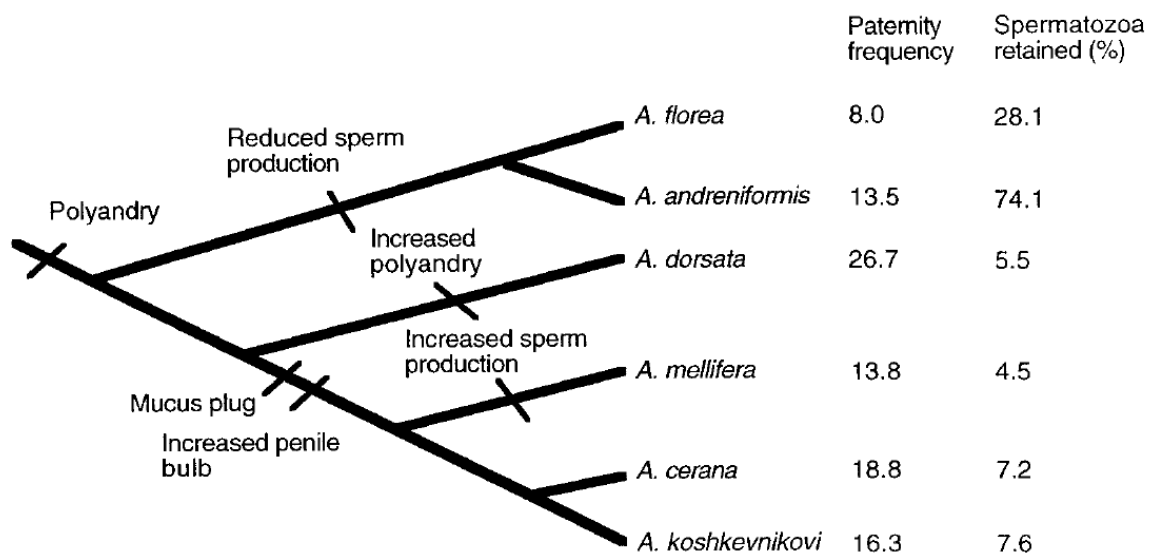


Figure 6 : Cladogramme d'espèces du genre *Apis* construit sur les caractéristiques du comportement sexuel. La fréquence moyenne d'accouplement avec des mâles par vol nuptial et le pourcentage de sperme de chaque mâle retenu dans la spermathèque sont indiqués pour chaque espèce. (D'après Alexander, 1991)

produits de la ruche exposant ainsi les abeilles à des doses chroniques de cette molécule (Johnson *et al.* 2013).

d. Autres contaminants anthropogéniques

Les abeilles sont également exposées aux polluants qui se retrouvent dans l'eau, l'air, le sol ou les végétaux. Elles ont en plus tendance à bio-accumuler certains métaux lourds tels que le plomb (Lambert *et al.*, 2012a). Elles absorbent aussi des polluants issus des rejets industriels, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques qui peuvent aussi être retrouvés dans différentes matrices de la ruche (Mullin *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2012b). De plus, il a été montré que la pollution atmosphérique pouvait réduire la capacité de détection de certaines abeilles pour les parfums de fleurs, affectant ainsi le butinage (Fuentes, 2008). Une élévation des ultraviolets, liée aux pertes d'ozone atmosphérique, pourrait enfin causer des retards et une diminution de la durée de la floraison de certaines plantes (Sampson et Cane, 1999).

e. Une espèce invasive : le frelon asiatique

Qu'elle soit alimentaire, parasite, prédatrice, ou compétitrice, une espèce invasive va moduler les interactions existantes dans un environnement où l'abeille s'est adaptée, avec un impact sur son évolution (Stout et Morales, 2009). Un exemple documenté et médiatisé est l'apparition du frelon asiatique (*Vespa velutina*) en Europe, et notamment en France. Son introduction remonterait à 2004, et serait liée à une importation de poteries chinoises du Yunnan en Aquitaine (Villemant *et al.*, 2006). Initialement prédateur de l'abeille asiatique (*A. cerana*), le frelon décime les gardiennes d'une ruche avant d'en prélever le couvain grâce auquel il nourrit ses larves. Si *A. cerana* a développé une stratégie de défense efficace contre ce prédateur, en le tuant par hyperthermie (Ken *et al.*, 2005), *Apis mellifera* n'a pas encore développé de comportement défensif alors qu'elle constitue environ 37% des proies du frelon en France (Rome *et al.*, 2011).

I.B.3.2. Diversité génétique de l'abeille

Chez les Hyménoptères, la fréquence des rapports sexuels, amenant le brassage génétique, varie fortement d'une espèce à l'autre, avec un cas particulier chez les espèces eusociales, qui présentent des reines reproductrices et des ouvrières stériles. Les abeilles sont caractérisées par une forte polyandrie. Lors d'un unique voyage nuptial, les reines diploïdes s'accouplent avec, en moyenne, 8 à 26 mâles haploïdes selon les espèces (**Figure 6**)

Tableau 1: Les maladies et ravageurs les plus communs de l'abeille.

| Maladie | Agent |
|---|------------------------------------|
| Bactérioses | |
| Loque américaine (MRC) | <i>Paenibacillus larvae</i> |
| Loque européenne | <i>Melissococcus plutonius</i> |
| Parasitoses | |
| Varroase (MDO) | <i>Varroa destructor</i> |
| Nosémose (MRC) | <i>Nosema</i> spp. |
| Infestation à <i>Tropilaelaps</i> (MRC) | <i>Tropilaelaps clareae</i> |
| Acariose à <i>Acarapis</i> | <i>Acarapis woodi</i> |
| Amibiase | <i>Malpighamoeba mellificae</i> |
| Mycoses | |
| Couvain pétrifié | <i>Aspergillus</i> spp. |
| Couvain plâtré | <i>Ascosphaera apis</i> |
| Viroses | |
| Maladie Noire | Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) |
| Maladie des ailes déformées | Deformed Wing Virus (DWV) |
| Couvain sacciforme | Sacbroodvirus SBV |
| Autres ravageurs | |
| Petit coléoptère de la ruche (MRC) | <i>Aethina tumida</i> |
| Fausse teigne | <i>Galleria mellonella</i> |

MDO: Maladie à Déclaration Obligatoire; déclaration à l'autorité administrative (Préfecture, DDSV), pas de mesures sanitaires
MRC: Maladie Réputée Contagieuse; déclaration à l'autorité administrative (Préfecture, DDSV), application de mesures sanitaires

(Alexander, 1991). La polyandrie augmente la diversité génétique au sein d'une colonie et conférerait des avantages adaptatifs dont la stabilité homéostatique de la colonie et une réduction des risques d'infection du couvain par des pathogènes (Tarpy *et al.*, 2003, 2013). Ainsi, la réduction du pool de diversité génétique disponible dans un paysage (réduction du nombre de colonies non apparentées) a un impact sur les abeilles.

Certains auteurs ont d'ailleurs émis l'hypothèse qu'il y aurait un lien entre la réduction de la diversité génétique de l'abeille domestique et les déclin de leurs populations (Potts *et al.*, 2010; Sheppard, 2012). Cette réduction de la diversité, visible dans les ruchers commerciaux (Sheppard, 1988), serait due à la sélection de colonies qui amènerait aujourd'hui à des échanges intercontinentaux de colonies génétiquement peu diversifiée. Pourtant, le commerce raisonné de colonies génétiquement diversifiées pourrait permettre d'introduire de nouveaux fonds génétiques dans les ruchers (Harpur *et al.*, 2012).

I.B.3.3 Pathogènes

De nombreux ravageurs et pathogènes peuvent causer des dommages aux colonies d'abeilles (**Tableau 1**). Les maladies des abeilles peuvent être décrites selon leurs symptômes mais elles seront ici brièvement citées en fonction du type d'agent pathogène.

a. Les bactéries des loques européenne et américaine

Les bactéries pathogènes des abeilles les plus connues sont les agents des loques, des maladies du couvain. *Bacillus larvae* est l'agent étiologique de la loque américaine (American Foulbrood), très contagieuse et mondialement répandue (Genersch, 2008). Les bactéries sont ingérées sous forme de spores par les larves et se multiplient jusqu'à provoquer la mort par septicémie (Genersch, 2010). L'aspect visqueux pris par les larves va empêcher le nettoyage correct des alvéoles, provoquer la dispersion des spores et entraîner la destruction du couvain.

Melissococcus plutonius est l'agent de la loque européenne (European Foulbrood). Les larves infectées deviennent flasques et meurent: elles prennent une couleur jaune-clair qui vire rapidement au brun, tout en se dissolvant en une masse semi-liquide (Forsgren, 2010).

Des antibiotiques sont reconnus comme efficace pour détruire ces pathogènes, mais leur utilisation est interdite car leurs effets sur les abeilles ne sont pas connus, et ils peuvent être retrouvés dans les matrices de la ruche tel que le miel, et donc avoir des répercussions sur la santé humaine (OIE, 2013).

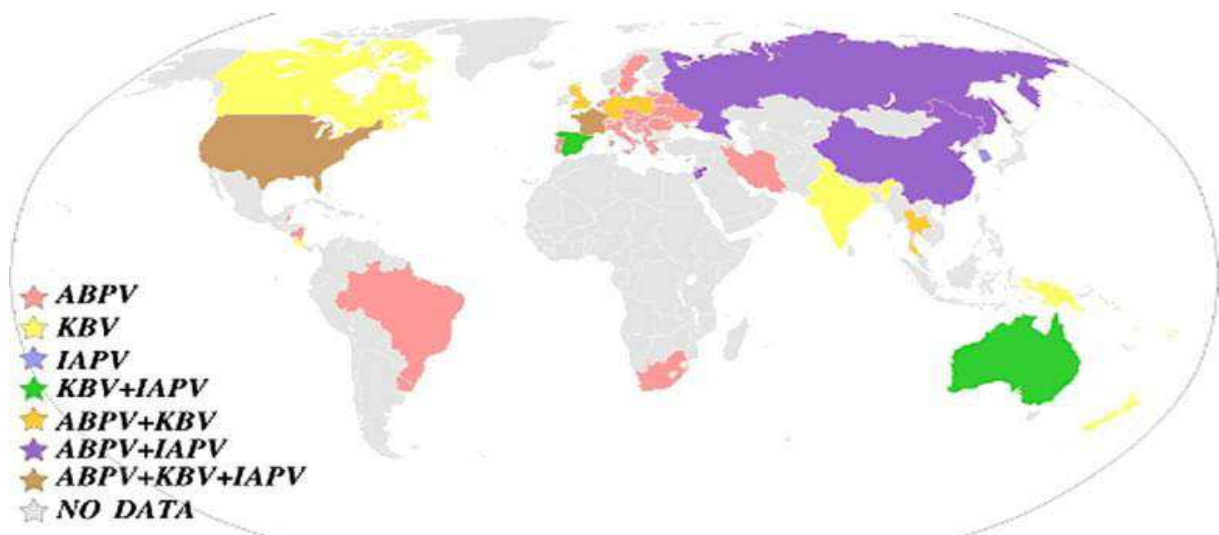


Figure 7 : Distribution mondiale des virus ABPV, IAPV et KBV. (D'après de Miranda et al., 2010)

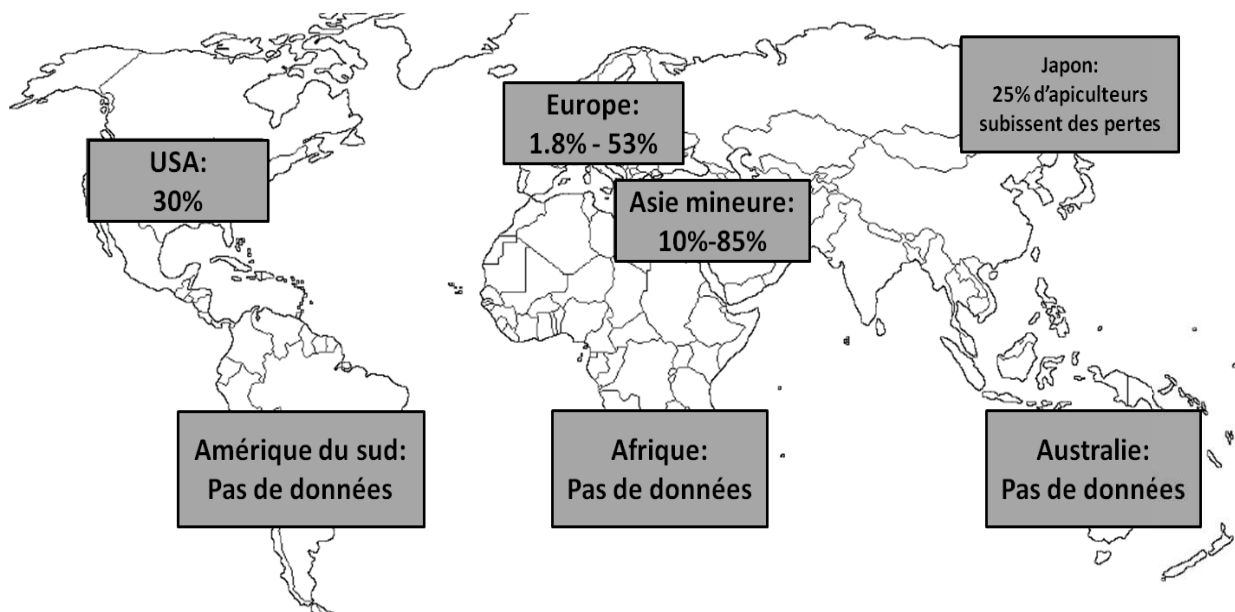


Figure 8 : Pertes mondiales de colonies d'abeilles dues à *Varroa destructor* rapportées en 2009. Bien que *V. destructor* soit mondialement présent, il n'y pas de rapport officiel de son impact sur les colonies d'abeilles sur tous les continents. (D'après Neumann et Carreck, 2010)

b. De nombreux virus

Actuellement, 18 virus ont été identifiés chez les abeilles mellifères (Chen et Siede, 2007). Hormis le virus filamenteux (FV), ce sont tous des virus à ARN. Seuls les virus les plus connus seront listés ici (Ribière *et al.*, 2008).

- L'ABPV (Acute Bee Paralysis Virus), le CBPV (Chronic Bee Paralysis Virus) et l'IAPV (Israeli Acute Paralysis Virus) provoquent des tremblements et des paralysies. Il a été suggéré que l'IAPV aurait un lien avec le CCD (Cox-Foster *et al.*, 2007).
- Le BQCV (Black Queen Cell Virus) ne cause pas de symptômes visibles sur les individus infectés mais est détecté par la présence de cellules de reines noircies.
- Le DWV (Deformed Wing Virus) provoque une déformation des ailes des abeilles qui sont alors incapables de voler.
- Le KBV (Kashmir Bee Virus) ne présente pas de symptômes mais serait lié à des mortalités.
- Le SBV (SacBrood Virus) attaque les larves, les faisant paraître comme entourées d'un sac rempli de liquide.

La présence simultanée de plusieurs virus dans les colonies a été constatée dans certains pays comme la France et les Etats-Unis (**Figure 7**). Certains de ces virus sont associés à *Varroa destructor*, qui serait le vecteur des virus ABPV, DWV et KBV.

c. Les acariens parasites

Le parasite *Varroa destructor* est souvent décrit comme un facteur important dans les pertes de colonies (**Figure 8**) (Dahle, 2010 ; Rosenkranz *et al.*, 2010). Initialement présent chez *A. cerana*, il semble avoir trouvé des conditions favorables à son développement chez *A. mellifera*. *V. destructor* se reproduit dans le couvain tout au long de l'année, avec un pic à la fin de l'été (Martin, 2001a). Les parasites se nourrissent de l'hémolymph des nymphes, ce qui altérerait leur développement, induisant des malformations, un affaiblissement des abeilles et leur mort prématurée (Garedew *et al.*, 2004; Boecking et Genersch, 2008). Lorsque les abeilles sortent du couvain, les acariens sont transportés par les ouvrières (**Figure 9**) et se propagent dans la colonie. De plus, *V. destructor* est connu pour être un vecteur de virus (**Cf. I.B.3.3.b.**) (Shen *et al.*, 2005a et 2005b) dont certains joueraient un rôle dans les effondrements induits par *Varroa* (Martin *et al.*, 2001b).

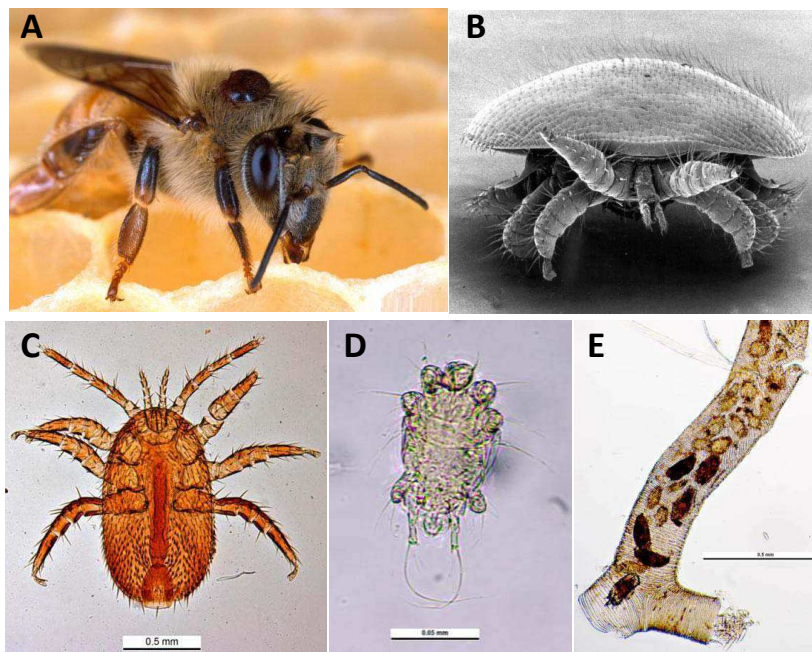


Figure 9 : Les acariens parasites de l'abeille. Ouvrière transportant un *Varroa destructor* sur son thorax (A). La femelle adulte est caractérisée par sa couleur rougeâtre. *V. destructor* (♀) au microscope électronique (B). *Tropilaelaps clareae* (C) et *Acarapis woodi* (♂) au microscope (D). *Acarapis woodi* dans un tube trachéal d'abeille. (A. S. Bauer, USDA; B. in Martin and Jones, 2007; C-E. PaDII, www.padil.gov.au).

D'autres acariens sont connus pour causer des dommages chez l'abeille (**Figure 9**). *Acarapis woodi*, un parasite interne du système respiratoire, se développe dans la trachée des abeilles, causant des lésions de la paroi et une obstruction des voies aériennes pouvant aller jusqu'à la suffocation (Garrido-Bailon *et al.*, 2012). *Tropilaelaps clareae*, à l'origine un acarien de l'abeille géante (*A. dorsata*) semble également être particulièrement virulent pour *A. mellifera* (Anderson et Morgan, 2007), chez laquelle il provoque des malformations du couvain et une mortalité accrue (Sammataro *et al.*, 2000).

d. Les champignons, dont les microsporidies

Des ascomycètes causent deux maladies facilement détectables dans le couvain. *Ascosphaera apis* provoque la maladie du couvain plâtré (Chalkbrood). Les larves infectées ne se nourrissent plus, meurent rapidement et se voient entourées d'un mycélium blanc (Aronstein et Murray, 2010). Plusieurs espèces du genre *Aspergillus*, moisissures très cosmopolites, ont également été détectées chez l'abeille. Elles sont responsables de la maladie du couvain pétrifié (Stonebrood), causant la momification des larves d'abeilles (Vojvodic *et al.*, 2011).

Au sein du règne des champignons, il existe un autre embranchement chez lequel on retrouve des parasites très originaux des abeilles mellifères : les microsporidies. Deux espèces infectent *A. mellifera* : *Nosema apis* et *Nosema ceranae*. *N. ceranae* apparaît comme une espèce de plus en plus ubiquiste et prévalente. Elle est même suspectée par certains auteurs d'être à l'origine de dépeuplement de colonies. C'est pourquoi elle constitue un sujet d'étude d'importance majeure.

II- *Nosema ceranae*, une microsporidie des abeilles

Parmi les nombreux facteurs délétères des abeilles mellifères, deux agents pathogènes, *Nosema apis* et *Nosema ceranae*, sont des microsporidies, un groupe de parasites apparentés aux champignons. Lors de la dernière décennie, *N. ceranae* est devenu un facteur de plus en plus incriminé dans le déclin des abeilles. Sa découverte ne date que de 1996 et il existe un manque de données concernant certaines de ses caractéristiques telles que son cycle de vie. Néanmoins, il est possible d'extrapoler à *N. ceranae* certaines caractéristiques d'autres espèces microsporidiennes, en se basant sur les connaissances solides accumulées depuis de nombreuses années.

L'étude des microsporidies a suscité un intérêt croissant depuis la pandémie de SIDA (Desportes-Livage, 1996). *Encephalitozoon cuniculi*, la première microsporidie découverte chez les mammifères en 1922 (Wright et Craighead, 1922) et chez l'homme en 1959 (Matsubayashi *et al.*, 1959), présente une forte prévalence chez les individus immunodéprimés (Weber *et al.*, 1994), mettant en évidence le caractère opportuniste de ces microorganismes. Depuis, la communauté scientifique n'a cessé de s'intéresser à ces parasites, infectant de nombreux animaux.

II.A. *Nosema ceranae*, un parasite microsporidien

II.A.1. Généralités sur les microsporidies

La première microsporidie fut décrite au milieu du XIX^{ème} siècle lorsque la pébrine ravageait les élevages de vers à soie (*Bombyx mori*) du sud de l'Europe, détruisant l'industrie européenne de la soie. En 1857, Nägeli identifia l'agent infectieux de cette maladie comme étant un microorganisme qu'il nomma *Nosema bombycis* (Nägeli, 1857). En 1865, Pasteur réussit à contrôler la maladie en isolant les individus infectés (Pasteur, 1870). Au vu des spécificités morphologiques du parasite, Balbiani (1882) suggéra de le classer dans un nouvel ordre, *Microsporidia*, un regroupement d'organismes caractérisés principalement à l'époque par la petitesse de leurs spores comparée aux autres protozoaires.

De nos jours, les microsporidies sont définies par plusieurs caractéristiques spécifiques:

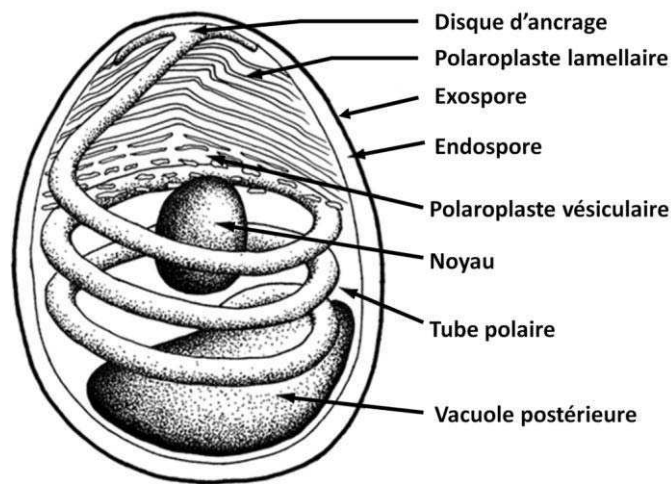


Figure 10: Schéma d'une spore de microsporidie. La spore comprend une paroi très épaisse composée de 2 couches, l'endospore et l'exospore, qui recouvre la membrane plasmique. Cette paroi rigide assure la protection du matériel infectieux appelé sporoplasme qui renferme également une structure tubulaire enroulée, le tube polaire, appareil impliqué dans l'invasion. (D'après Keeling et Fast, 2002)

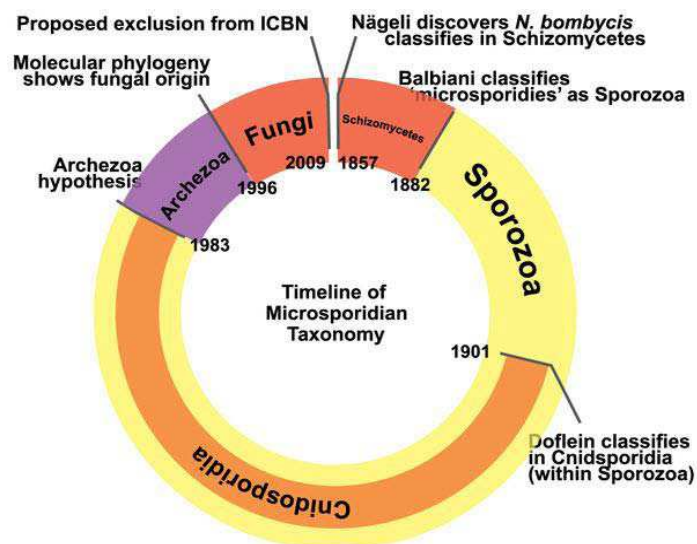


Figure 11: Historique de la position taxonomique des microsporidies. A leur découverte, il y a plus de 150 ans, les microsporidies ont été considérées en comme des Schizomycètes. Plus tard, et pendant plus de 100 ans, elles ont été placées parmi les Sporozoa, et plus particulièrement chez les Cnidospora. En 1983, une hypothèse, basée sur des caractères structuraux, suggère qu'elles seraient des eucaryotes primitifs. Au début, les données moléculaires accumulées tendaient à confirmer cela, mais il devint clair après plus de 10 ans qu'elles étaient des champignons particuliers même si leur place exacte est encore discutée. (D'après Keeling, 2009)

- Ce sont des parasites eucaryotes à développement intracellulaire obligatoire et elles sont dépourvues de mitochondries, ce qui les rend très dépendantes de leur hôte d'un point de vue énergétique.
- Elles survivent dans l'environnement sous forme de spores microscopiques résistantes et dont l'organisation est très spécialisée (**Figure 10**). Les spores contiennent un long filament enroulé en spirale, appelé filament polaire ou tube polaire, organe participant au processus d'invasion des cellules hôtes (**Figure 10**).
- Leurs ribosomes sont de types procaryotes, avec un coefficient de sédimentation de 70S, faisant des microsporidies un groupe de parasites eucaryotes originaux dont l'affiliation taxonomique a longtemps été débattue.

II.A.2 Une affiliation phylogénétique controversée

Le positionnement phylogénétique des microsporidies a été sujet à débat et à de multiples changements comme le montre l'historique de leur taxonomie (**Figure 11**). Tout d'abord considérée comme une levure par Nägeli, *Nosema bombycis* fut classée parmi les Schizomycètes (un ancien conglomérat de levures et de bactéries). Puis, sur la base de critères morphologiques, les microsporidies ont été placées par Balbiani (1882) dans les Sporozoa, un embranchement de parasites pouvant former des spores. Au début du siècle dernier, la présence de spores munies d'un filament polaire avait provoqué l'inclusion des microsporidies au sein de l'ordre des Cnidospora, avec d'autres organismes qui semblaient partager ces mêmes caractères. Grâce aux progrès de la microscopie, elles furent ensuite un temps classées sous le terme Archezoa (Cavalier-Smith, 1983): des eucaryotes primitifs dépourvus d'organites considérés comme quasi-universels dans ce domaine taxonomique (mitochondries et peroxysomes) et présentant un appareil de Golgi non structuré en dictyosomes. Dans les années 1980, d'autres données vinrent appuyer cette origine primitive: les coefficients de sédimentation des ribosomes microsporidiens et de leurs sous-unités sont en effet similaires à ceux des procaryotes (Ishihara et Hayashin, 1968; Cury *et al.*, 1980) et leur ARNr 5,8S n'existe pas sous forme libre, la séquence correspondante restant fusionnée à l'extrémité 5' de la grande sous unité comme chez les procaryotes (Vossbrinck et Woese, 1986). Cependant, une décennie plus tard, l'identification de séquences codant pour des protéines de stress adressées aux mitochondries (HSP70) permit d'envisager une évolution régressive avec pertes secondaire des mitochondries (Germot *et al.*, 1997; Hirt *et al.*, 1997; Peyretailade *et al.*, 1998a) et ébranla donc fortement la théorie Archezoa. Cette théorie fut encore contredite par

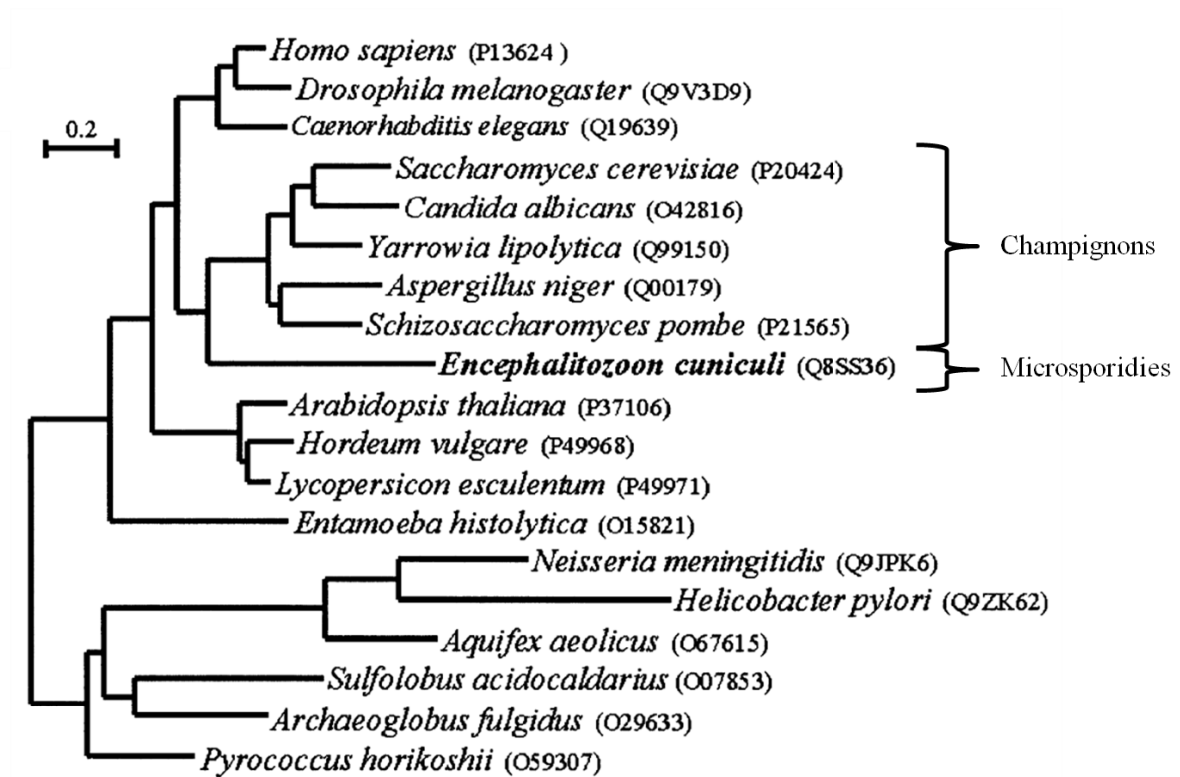


Figure 12 : Arbre phylogénétique basé sur la protéine SRP54. La protéine universelle SRP54 appartient au complexe ribonucléoprotéique SRP (signal recognition particle). *E. cuniculi* émerge près des champignons. Numéro d'accèsion SWISSPROT entre parenthèses. (D'après Thomarat *et al.*, 2004)

la découverte des mitosomes, des reliques de mitochondries ayant perdu nombre de fonctions mitochondriales pour ne garder que celles impliquées dans les assemblages de complexe fer-soufre (Williams *et al.*, 2002 ; Tsaousis *et al.*, 2008).

L'hypothèse Archezoa a été définitivement abandonnée suite aux études de phylogénies moléculaires basées sur les gènes des ARNr, et les facteurs d'élongation EF-1 α et EF-2, qui indiquent un branchement plus tardifs des séquences des microsporidies, relativement proches de celles des champignons (Vossbrinck *et al.*, 2004). Dans les années 2000, grâce au séquençage du génome d'*E. cuniculi* (Katinka *et al.*, 2001) et d'études phylogénétiques portant sur la grande sous-unité des ARNr (van de Peer *et al.*, 2000), et sur plusieurs dizaines de protéines, les microsporidies sont apparues comme des eucaryotes ayant des gènes sujets à une forte réduction de taille, avec des vitesses d'évolutions variables, et dont la parenté avec les champignons est de plus en plus acceptée (**Figure 12**) (Keeling et Fast, 2002; Thomarat *et al.*, 2004). Dans une nouvelle classification établie par Lecointre et Le Guyadier (2001), les microsporidies sont même classées parmi les champignons comme un groupe frère des eumycètes. Plus récemment, une étude phylogénétique basée sur le locus de gènes liés au sexe a placé les microsporidies au sein même des eumycètes, à proximité des zygomycètes (Koestler et Ebersberger, 2011). Cependant, Capella-Gutiérrez *et al.* (2012) ont confirmé par une approche de phylogénomique la place des microsporidies comme une branche précoce au sein de l'arbre des champignons. La place de ces parasites a donc longtemps été débattue, ce qui n'est pas étonnant au vu de la très grande diversité existant entre ses membres.

II.A.3. Un phylum fortement diversifié

De nos jours, les microsporidies regroupent plus de 1 300 espèces réparties dans plus de 150 genres (Didier et Weiss, 2006). Les microsporidies sont connues comme pouvant infecter la quasi-totalité du règne animal (Canning et Lom, 1986 ; Canning, 1993). Elles ont un impact sanitaire majeur sur des activités commerciales tels que la pisciculture (*Loma salmonae*), la sériculture (*Nosema bombycis*), la pénéculture (*Thelohania* spp.) ou l'apiculture (*Nosema apis* et *Nosema ceranae*). Certaines espèces microsporidiennes sont responsables de zoonoses : un passage de l'animal à l'Homme est en effet vraisemblable pour *Encephalitozoon cuniculi* dont les isolats issus de patients sont de même sous-types que ceux provenant de chiens et de lapins (Mathis *et al.*, 1997). Bien que partageant toutes des caractéristiques semblables, les microsporidies forment un groupe hautement diversifié.

Les microsporidies présentent notamment des variations au niveau de la morphologie de la spore aussi bien entre espèces qu'au sein d'une même espèce chez des hôtes différents: taille et forme (ovoïde, sphérique, en forme de bâton ou de croissant ; de 1 μm pour *Enterocytozoon bieneusi* à 40 μm pour *Bacillidium filiferum* ; Vavra et Larsson, 1999), épaisseur de la paroi, nombre de noyaux, nombre d'enroulements du tube polaire (Canning, 1993; Dunn et Smith, 2001). Le nombre de tours de tube polaire à l'intérieur de la spore varie de 4 à 30 et est parfois utilisé comme un caractère taxonomique.

Une grande diversité est également présente au niveau de la taille des génomes : de 2,3 Mpb pour *Encephalitozoon intestinalis* (le plus petit génome eucaryote actuellement connu) à 24 Mpb pour *Octosporea bayeri* (Corradi *et al.*, 2010). *N. ceranae* et *N. apis* possèdent des génomes dont les tailles sont estimées à 7,86 Mpb et 8,5 Mpb respectivement (Cornman *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2013). Le nombre de chromosomes est aussi très variable d'une espèce à une autre allant de 8 à 18 (Biderre *et al.*, 1995).

Le cycle de développement présente aussi des disparités à la fois dans son contexte intracellulaire (directement au contact du cytoplasme de la cellule-hôte ou bien à l'intérieur d'une vacuole parasitophore) et dans son déroulement (nombre de divisions au cours de la sporogonie). De plus, la mise en évidence de formes monocaryotiques et diplocaryotiques chez les microsporidies du genre *Amblyospora* (Hazard et Brookbank, 1984), ainsi que la présence de complexes synaptonémaux (Loubès *et al.*, 1976), et la présence dans les génomes d'homologues aux complexes de gènes liés au sexe chez les champignons (Lee *et al.*, 2010) suggèrent l'existence d'un cycle sexuel ou de reliques qui lui sont associées, chez certaines espèces. Bien qu'il n'existe aucune donnée expérimentale sur la sexualité des microsporidies, ces organismes sont souvent cités comme asexués. Des indices phylogénétiques montrent qu'ils dériveraient d'un ancêtre champignon présentant un mode de reproduction sexuel, fonction qui aurait été perdue par la suite lors d'événements évolutifs (Koestler et Ebersberger, 2011). La présence ou l'absence de cycle sexué pourrait avoir des conséquences importantes dans les échanges génétiques et donc dans l'évolution de ce groupe.

Leurs voies de dissémination des microsporidies sont de plus en plus connues et les spores sont la source principale de contamination dans l'environnement. Pour de nombreuses espèces, un grand nombre de spores peut être excrété dans les fèces des hôtes infectés (transmission directe fécale-orale), et parfois dans l'urine (Goertz *et al.*, 2007). L'infection se ferait le plus souvent via l'absorption d'eau ou d'aliments contaminés (Dowd *et al.*, 1998). Il existe néanmoins d'autres voies de contamination, comme la transmission par voie aérienne

(Bryan et Schwartz, 1999), la transmission verticale de la mère à la progéniture, ou par le biais de vecteurs, notamment certains insectes (Didier *et al.*, 1998).

Si certaines microsporidies sont connues pour n'infecter que peu de types cellulaires, principalement ceux du compartiment gastro-intestinal, il en existe d'autres ayant plusieurs tissus cibles. *Enterocytozoon bieneusi*, l'espèce la plus fréquemment détectée chez l'homme (Desportes *et al.*, 1985), infecte un large spectre de tissus (compartiments gastro-intestinal, hépatique, pancréatique, oculaire...) chez des patients atteints de SIDA mais aussi chez des personnes immunocompétentes (Sandfort *et al.*, 1994; Anane et Attouchi, 2010).

Toutes ces caractéristiques montrent à quel point les microsporidies sont diversifiées. Les connaissances accumulées sont heureusement nombreuses, et grâce à elles, la communauté scientifique va pouvoir caractériser de plus en plus facilement de nouvelles espèces, à l'image de *Nosema ceranae*, un parasite microsporidien émergent des abeilles mellifères.

II.B. *Nosema ceranae* : une microsporidie de l'abeille

Parmi les 150 genres microsporidiens répertoriés, 69 d'entre eux au moins ont pour hôte un insecte (Becnel et Andreadis, 1999). Le genre *Nosema*, le plus fréquent chez ces invertébrés, comporte plus de 150 espèces décrites et infecte la quasi-totalité des ordres d'insectes, et particulièrement les Lépidoptères et les Hyménoptères (Sprague, 1977). De nombreuses études phylogénétiques ne différencient pas clairement les espèces du genre *Nosema* et les espèces du genre *Vairimorpha* (Baker *et al.*, 1994 ; Moodie *et al.*, 2003 ; Ironside, 2007), connues elle aussi pour infecter des arthropodes. Les limites de ces deux genres nécessitent donc certainement des réajustements et certains auteurs préfèrent mentionner l'ensemble du "groupe *Nosema/Vairimorpha*", en supposant sa monophylie. Identifiée très récemment, *Nosema ceranae* est rapidement devenue un sujet d'étude fortement popularisé et médiatisé par le fait qu'elle soit l'un des deux parasites microsporidiens (avec *Nosema apis*) sévissant chez *Apis mellifera*.

II.B.1 Découverte de *Nosema ceranae*

Jusqu'à la découverte de *N. ceranae*, dès qu'une infection était due à une microsporidie dans une colonie d'abeilles, *N. apis* était incriminée par défaut puisqu'aucune autre espèce n'avait alors été identifiée. *N. apis* fut d'ailleurs l'une des premières

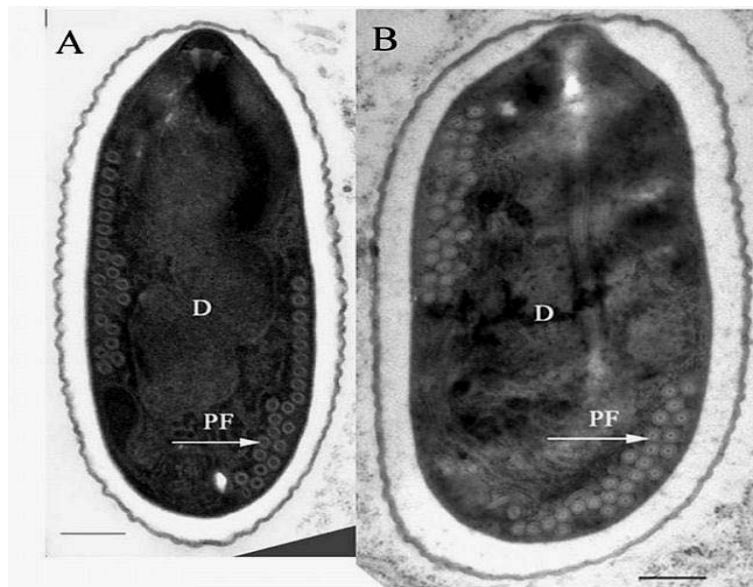


Figure 13 : Photographies en microscopie électronique à transmission de coupes transversales de spores de *Nosema ceranae* (A) et de *Nosema apis* (B). D: diplocaryon; PF avec flèches: tube ou filament polaire. Les spores de *N. apis* sont légèrement plus grandes ($6\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$) que celles de *N. ceranae* ($5.5\ \mu\text{m} \times 3.3\ \mu\text{m}$). L'enroulement du tube polaire comprend 18 à 21 tours pour *N. ceranae* contre plus de 30 chez *N. apis*. Echelle : $0.5\ \mu\text{m}$. (Friès *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2009)

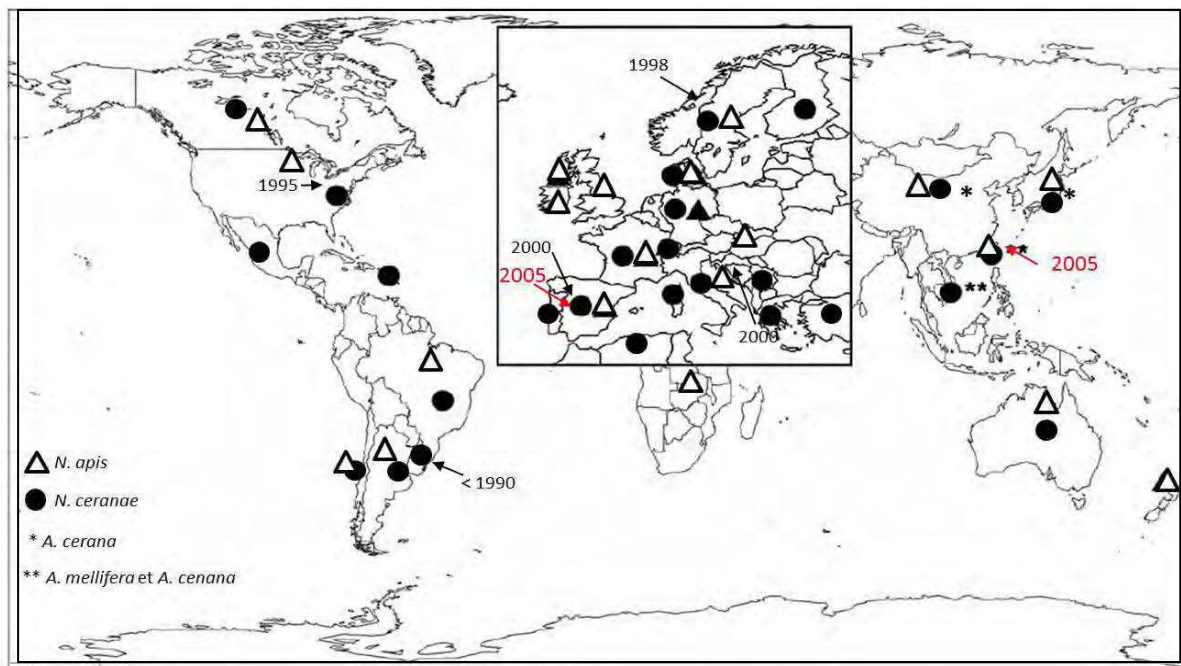


Figure 14 : Distribution géographique de *N. ceranae* et *N. apis*. Les flèches rouges indiquent l'année et le lieu de la première détection de *N. ceranae* chez *A. mellifera*; les flèches noires indiquent l'année et la localisation d'échantillons prélevés avant 2005, et datés ultérieurement. (Adapté de Klee *et al.*, 2007)

microsporidies décrites et observées, il y a déjà plus d'un siècle (Zander, 1909). Les diagnostics d'infections étaient faits par microscopie optique, technique qui, on le sait à présent, ne permet pas de différencier les spores des deux espèces (OIE, 2013). Fries (1996) utilisa la microscopie électronique (**Figure 13**) et les outils de biologie moléculaire, obtenant la séquence codant l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique (SSUrDNA pour small subunit ribosomal DNA) des parasites, et constata qu'il existait une seconde espèce microsporidienne, celle-ci infectant l'abeille mellifère asiatique *Apis cerana*, qu'il nomma *Nosema ceranae*. En 2005, la présence de *N. ceranae* fut mise en évidence pour la première fois chez *A. mellifera*, à la fois en Europe et en Asie (Higès *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007), en se basant là aussi sur la séquence du SSUrDNA des isolats.

II.B.2. Hypothèse du saut d'espèce, spectre d'hôte et répartition géographique

Un événement majeur dans l'histoire de *N. ceranae* aurait été un transfert d'hôte de l'abeille asiatique *A. cerana* vers l'abeille européenne *A. mellifera* (Klee *et al.*, 2007), transfert qui remonterait à plus de vingt ans, comme le suggère l'analyse d'échantillons datant de 1990 en Uruguay (Invernizzi *et al.*, 2009). Il est cependant impossible de dater précisément quand ce saut aurait eu lieu. Ainsi, la détection synchrone du parasite en Europe et en Asie n'aurait pas de lien direct avec le saut d'hôte d'*A. cerana* vers *A. mellifera* du parasite, mais serait plutôt due à l'utilisation simultanée d'outils moléculaires plus spécifiques.

Depuis sa découverte, la présence de *N. ceranae* a été rapportée dans de nombreux continents (**Figure 14**) (Huang *et al.*, 2007 ; Cox-Foster *et al.*, 2007; Giersch *et al.*, 2009; Higès *et al.*, 2009a). Le parasite a également été détecté chez d'autres abeilles à miel asiatiques telles que *A. florea* et *A. dorsata* (Chaimanee *et al.*, 2010) ainsi que chez des espèces de bourdons du genre *Bombus* (Plischuk *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012). Il est maintenant reconnu que *N. ceranae* (tout comme *N. apis*) est mondialement retrouvée (Higès *et al.*, 2010).

II.B.3. Nosémoses des abeilles

La présence de deux microsporidies chez l'abeille a poussé les scientifiques à considérer deux modèles cliniques distincts relatifs aux symptômes spécifiques de chaque espèce: les termes de nosémose de « type A » et « type C » ont alors été proposés en 2009 pour les infections dues à *N. apis* et *N. ceranae*, respectivement (COLOSS, 2009).

II.B.3.1. Nosémose de type A

Chez les abeilles infectées, les principaux symptômes d'une infection par *N. apis* sont des tremblements, des abdomens dilatés, de nombreuses marques fécales brunes sur les cadres et les façades de la ruche, des abeilles peu vivaces voire mortes à proximité de la ruche, et une diminution plus visible au printemps de la taille du couvain et de la colonie (OIE, 2008). Les colonies montrent généralement peu de signes d'infection durant l'été, un léger pic du nombre de spores détectées chez les hôtes en automne et une légère augmentation des individus infectés en hiver. Les abeilles nourricières semblent souffrir d'une activité réduite des glandes hypopharyngiennes (Webster *et al.*, 2004). Il est aussi possible que la reine soit remplacée, même si seules des preuves empiriques ont été avancées.

II.B.3.2. Nosémose de type C

La maladie due à *Nosema ceranae* ne présente pas les symptômes évidents rencontrés lors d'une infection par *N. apis*. Selon l'équipe d'Higès (2010), le temps d'incubation dans une colonie infectée peut être assez long, ne laissant apparaître aucun symptôme. Il semble cependant qu'une colonie infectée montrerait quelques caractéristiques cliniques comme une période de reproduction plus longue en période hivernale, une plus forte proportion des cadres utilisés pour le couvain, et une diminution de la production et du stockage de miel (OIE, 2013). Il est néanmoins reconnu qu'une colonie infectée peut ne pas présenter de signes cliniques évidents de la maladie, même lorsque celle-ci cause des pertes significatives dans la production de miel et dans l'efficacité de la pollinisation de la colonie.

Contrairement à *N. apis*, une infection par *N. ceranae* peut être détectée dans des échantillons tout au long de l'année. En effet, le manque de saisonnalité fut suspecté lors de l'analyse d'échantillons datant d'entre 1999 et 2005 (Martin-Hernandez *et al.*, 2007), et redémontré plus récemment (Tapasztai *et al.*, 2009).

II.B.3.3. Prévalence

Ce qui attire l'attention des scientifiques et des acteurs de l'apiculture vers *N. ceranae* est le fait qu'elle semble être l'espèce la plus retrouvée dans les populations d'abeilles infectées par une microsporidie, comme cela a été montré en Europe et aux Etats-Unis (Chauzat *et al.*, 2007; Stevanovic *et al.*, 2010; Martin-hernandez *et al.*, 2011a; Traver et Fell, 2011), avec quelques exceptions, en Europe notamment où *N. apis* est plus souvent observée (Gisder *et al.*, 2010; Forsgren et Fries, 2013). Il semble aussi que le taux de prévalence de *N. ceranae* serait plus élevé dans les régions les plus chaudes, (Fries, 2010). En revanche, cette

espèce ne semble pas prévenir une infection par *N. apis* puisqu'aucune compétition ne semble s'instaurer entre les deux parasites dans un même environnement (Martin-hernandez *et al.*, 2011a).

Les premières études publiées portant sur des infections expérimentales d'*A. mellifera* par *N. ceranae* ont très clairement montré que le parasite était fortement pathogène pour cet hôte (Higès *et al.*, 2007) et qu'il induisait plus de mortalité que *N. apis* (Paxton *et al.*, 2007). D'autres études ont cependant démontré le caractère aléatoire des taux de mortalité dus à *N. ceranae* (Hartmann *et al.*, 2009), confirmant le besoin de standardiser les protocoles d'expérimentations (COLOSS, 2009).

Néanmoins, et bien que certaines caractéristiques pathologiques de l'infection par *N. ceranae* se rapprochent de celles de *N. apis*, *N. ceranae* reste la microsporidie incriminée dans les pertes de colonies (Higès *et al.*, 2008b). Malheureusement, beaucoup d'aspects de son cycle de vie et de sa pathogénie restent inconnus à ce jour.

II.C. Cycle de vie de *Nosema ceranae*

II.C.1. Voies de transmission

II.C.1.1. Transmission entre individus au sein de la colonie

L'infection des abeilles par les *Nosema* peut se dérouler de différentes façons, mais semble toujours liée à l'ingestion de spores. Ces dernières se transmettent lors des activités de nettoyage de fèces contaminées (Higès *et al.*, 2010), et de l'entretien des poils du corps. Ces comportements sont caractéristiques des jeunes abeilles dédiées à maintenir un environnement propre (Winston, 1987). La trophallaxie, c'est-à-dire l'échange de nourriture entre les abeilles, est également un vecteur de transmission (Smith, 2012), et est probablement la voie d'infection principale des reines (Higès *et al.*, 2009b) et des mâles, qui sont essentiellement nourris par les ouvrières (Winston, 1987). Le miel, le pollen et la cire deviennent contaminés pendant leur manipulation par les ouvrières lors de la récolte ou du stockage, ils constituent un réservoir de spores pouvant contribuer à leur transmission (Higès *et al.*, 2008a; Botias *et al.*, 2012). Avant un essaimage, caractérisé par le départ d'une reine et d'un important groupe d'abeilles, les ouvrières ont tendance à remplir leur jabot avec du miel pour couvrir les besoins énergétique précoce de la nouvelle colonie, emmenant ainsi les spores de *N. ceranae* dans la future colonie (Winston, 1987).

N. ceranae, comme *N. apis*, présente un taux de multiplication dépendant de la température, et le nombre de parasites augmente lorsque les abeilles sont longtemps

confinées, augmentant le risque de défécation (réservoir parasitaire) et de mort. Au printemps, le niveau d'infection peut rapidement augmenter à cause du nettoyage des alvéoles et des cadavres par les abeilles, qui s'exposent ainsi à une contamination accrue. La contamination de la cire par les fèces, surtout au niveau du couvain, pourrait fournir assez d'inoculum pour relancer une infection, et serait probablement un facteur important de récurrence (OIE, 2013).

II.C.1.2. Transmission entre colonies

La transmission de parasites entre ruches n'a pas réellement été étudiée mais elle pourrait avoir lieu de différentes façons :

- La « dérive » est un comportement typique des ouvrières butineuses ou des mâles qui rentrent dans une colonie différente de celle d'origine, probablement due à des problèmes d'orientation lorsque la densité des colonies dans un rucher est élevée (Winston 1987). Une étude montre aussi qu'une infection par *N. ceranae* peut affecter le comportement en vol des abeilles, pouvant ralentir leur retour à la ruche et altérer leur orientation (Krajl et Fuchs, 2010).
- Le « pillage » est déclenché par le manque de ressources mellifères qui stimulent les ouvrières à récupérer le miel stocké dans des colonies étrangères, et qui peut contenir des spores de *Nosema* (Winston, 1987).
- Lors du butinage, des abeilles saines peuvent entrer en contact avec les déjections présentes dans l'environnement d'abeilles infectées. Elles vont ainsi ramener des spores du parasite au sein de leur colonie. De même, lors du « nettoyage » du matériel apicole dans un rucher, des abeilles de colonies différentes peuvent venir récupérer le miel restant sur les mêmes éléments apicoles, et donc se transmettre le parasite.

II.C.2. La spore

II.C.2.1. Généralité

Le stade déterminant dans la stratégie d'invasion de toute microsporidie est la spore, une cellule hautement organisée (**Figure 10**). Elle est le seul stade facilement reconnaissable, à partir duquel l'espèce parasitaire peut être identifiée par microscopie. Concernant *N. ceranae*, les spores sont de forme ovoïde-cylindrique avec une longueur de 3.3 à 5.5 μm et une largeur de 2.3 à 3 μm (**Figure 13**) (Fries *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 2009). Elles sont facilement identifiables dans les fèces ou contenus intestinaux des abeilles car elles présentent une forte réfraction en microscopie à contraste de phase.

La spore est le seul stade viable dans l'environnement (hors d'une cellule hôte), car extrêmement résistante aux agressions extérieures. Les spores de *N. ceranae* peuvent résister à des températures de 60°C pendant 6 h, être congelées pendant 3 semaines ou être conservées pendant 1 an à 4°C et ne perdre respectivement que 0%, 20% et 75% de leur viabilité. De plus, leur viabilité est conservée plus d'une semaine après dessiccation. (Fenoy *et al.*, 2009). Ceci est principalement dû à l'épaisse paroi entourant la membrane plasmique de la spore.

II.C.2.2. La paroi sporale

La membrane plasmique de la spore mature est surmontée d'une paroi épaisse et rigide procurant une très grande résistance lorsque la spore est libérée dans le milieu environnant. Chez *N. ceranae*, elle mesure de 137 à 183 nm d'épaisseur (Fries *et al.*, 1996). De nature protéo-chitineuse, elle est constituée de deux couches superposées, facilement identifiables en microscopie électronique : l'exospore et l'endospore. L'exospore est dense aux électrons, mesure entre 14 et 53 nm (Fries *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 2009) et contient principalement du matériel protéique. En revanche, l'endospore apparaît translucide en microscopie électronique, présente une épaisseur de 134 à 158 nm (Fries *et al.*, 1996) et est composée d'un réseau de fibrilles de chitine associées à des protéines formant des liaisons avec l'exospore et la membrane plasmique, participant ainsi au maintien de la structure de la spore (Bigliardi *et al.*, 1996). La partie la plus interne de cette couche semble être en contact étroit avec la membrane cytoplasmique. La taille de l'endospore est très amincie (36nm d'épaisseur) au niveau de la partie antérieure de la spore, zone où le tube polaire sera éjecté.

Le nombre exact de protéines constituant la paroi sporale (SWP pour Spore Wall Protein) chez les microsporidies est inconnu. Chez *N. bombycis*, une étude menée par Wu *et al.* (2008) a mis en évidence la présence d'au moins 14 protéines, dont SWP25 et SWP30 dans l'endospore, et SWP32 dans l'exospore (Wu *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2008). D'autres protéines ont par la suite été caractérisées: SWP26, présente dans l'endospore et la membrane plasmique lors de la formation de l'endospore (Li *et al.*, 2009) et SWP5, dans l'exospore et dans les régions du tube polaire des spores matures (Li *et al.*, 2011). Des protéines sporale ont également été mises en évidence chez d'autres microsporidies comme les protéines SWP1 et SWP2 au niveau de l'exospore des espèces *E. cuniculi* et *E. intestinalis* (Bohne *et al.*, 2000 ; Hayman *et al.*, 2001), EnP1 et EnP2 (EnP pour Endospore Protein) dans l'endospore d'*E. cuniculi* (Peuvel-Fanget *et al.*, 2006) et une chitine déacétylase, localisée à l'interface de l'endospore et de la membrane plasmique chez *E. cuniculi* (EcCDA, Brosson *et al.*, 2005). Le séquençage de *N. ceranae* a permis de mettre en évidence des gènes codant des protéines

homologues de SWP25, SWP26, SWP30, de l'hypothétique SWP4 (HSWP4) de *N. bombycis* et de EnP1, mais elles n'ont pas fait l'objet d'études ciblées pour montrer leur présence chez ce parasite.

II.C.3. Invasion

Après ingestion des spores, *N. ceranae* envahit les cellules épithéliales de l'intestin moyen. Les autres tissus que ceux de l'intestin ne semblent pas être affectés de la même façon. Une étude montre que les spores ne sont pas observables sur des coupes histologiques de l'iléon, du rectum, des tubes de Malpighi, des ovaires ou du corps gras (Higès *et al.*, 2009b). Selon les études l'ADN du parasite peut (ou non) être détecté par PCR dans les autres tissus que ceux du tractus digestif (Chen *et al.*, 2009; Huang et Solter, 2013), mais les contaminations d'un organe lors de dissections sont très fréquentes, pouvant alors amener à des erreurs de diagnostic.

II.C.3.1. Appareil invasif

L'appareil invasif ou appareil d'extrusion est un ensemble spécialisé de quatre éléments cytoplasmiques de la spore mature:

Le disque d'ancrage, aussi appelé « capuchon polaire », est situé au pôle antérieur de la spore, à proximité de la zone amincie de l'endospore. Deux parties sont distinguées : le sac polaire, structure vésiculaire aplatie formant un dôme qui coiffe le cytoplasme antérieur de la spore, et le disque d'ancrage proprement dit, de forme biconvexe et présentant une série de couches plus ou moins denses. Ce disque assure une étroite connexion entre la partie centrale du sac polaire et l'extrémité du tube polaire.

Le tube polaire est le composant principal de l'appareil d'invasion. La dévagination extrêmement rapide de ce tube, de l'ordre de quelques millisecondes (Frixione *et al.*, 1992), assure l'expulsion de l'élément infectieux (ou « sporoplasme », constitué du noyau et des composants cytoplasmiques de la spore), et permet son inoculation dans la cellule-hôte. Il comprend une partie antérieure rectiligne appelée manubrium, reliée au disque d'ancrage, et une partie postérieure enroulée sur un ou plusieurs rangs et nettement plus longue que le manubrium. Le nombre de tours de spires varie selon les espèces (4 à 30) (Canning *et al.*, 1993), et se situe entre 18 et 23 chez *N. ceranae* (Fries *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 2009). Chez

cette dernière, le tube polaire a une largeur de 96 à 102 nm, et sa coupe transversale révèle quatre parties distinctes : 1) une membrane externe, 2) une couche dense aux électrons de la même taille que la membrane externe, 3) une couche moins dense aux électrons d'environ 20 nm et 4) un centre granulaire d'environ 35nm. Dans la partie la plus postérieure du tube, le nombre de couches est réduit à 2.

La biogenèse du tube polaire implique une importante sécrétion de protéines, appelées PTPs pour Polar Tube Proteins (Vavra, 1976b). Trois protéines différentes ont été identifiées chez *E. cuniculi* : PTP1, PTP2 et PTP3 (Delbac *et al.*, 1998 ; Delbac *et al.*, 2001 ; Peuvel *et al.*, 2002). Des homologues de PTP1 et PTP2 ont été retrouvées chez *E. hellem* (Keohane *et al.*, 1998) et *E. intestinalis* (Delbac *et al.*, 2001), et, plus récemment, chez *Antonospora locustae*, *Paranosema grylli* et *Anncaliia algerae* (Polonais *et al.*, 2005, 2013). Le séquençage du génome de *N. ceranae* a permis de mettre en évidence des gènes codant des protéines homologues à ces trois familles de PTPs (Cornman *et al.*, 2009), mais aucune étude n'a été menée pour les identifier directement dans les spores.

Le polaroplaste est un système membranaire volumineux (pouvant occuper plus du tiers du volume sporal) qui s'étend sur la plus grande partie de la région antérieure de la spore, entre le disque d'ancrage et le noyau, et encercle le manubrium. Sa partie antérieure, dite lamellaire, est caractérisée par un empilement de structures membranaires très aplaties. Elle serait à l'origine de la membrane plasmique du sporoplasme libéré à l'intérieur de la cellule-hôte (Weidner *et al.*, 1984). Sa partie postérieure est composée d'une région vésiculaire dense aux électrons.

L'élément postérieur ou postérosome, localisé au pôle basal de la spore mature, est délimité par une membrane. Très peu décrit, son diamètre serait de 0,75 nm. Selon les études, il pourrait s'agir d'une vacuole dont le contenu présente un amas très opaques aux électrons, mais sa nature reste inconnue. Il a été suggéré que le postérosome pourrait être connecté au tube polaire (Fries, 1996). Après extrusion du tube polaire, l'élément postérieur devient beaucoup plus imposant dans la spore, laissant penser à un corps mou, sous pression qui revient à son état relâché après extrusion et libération d'une partie du contenu sporal. Par analogie aux autres microsporidies, cet élément semblerait alors être une vacuole dont le gonflement aurait un rôle dans le processus d'extrusion du tube polaire.

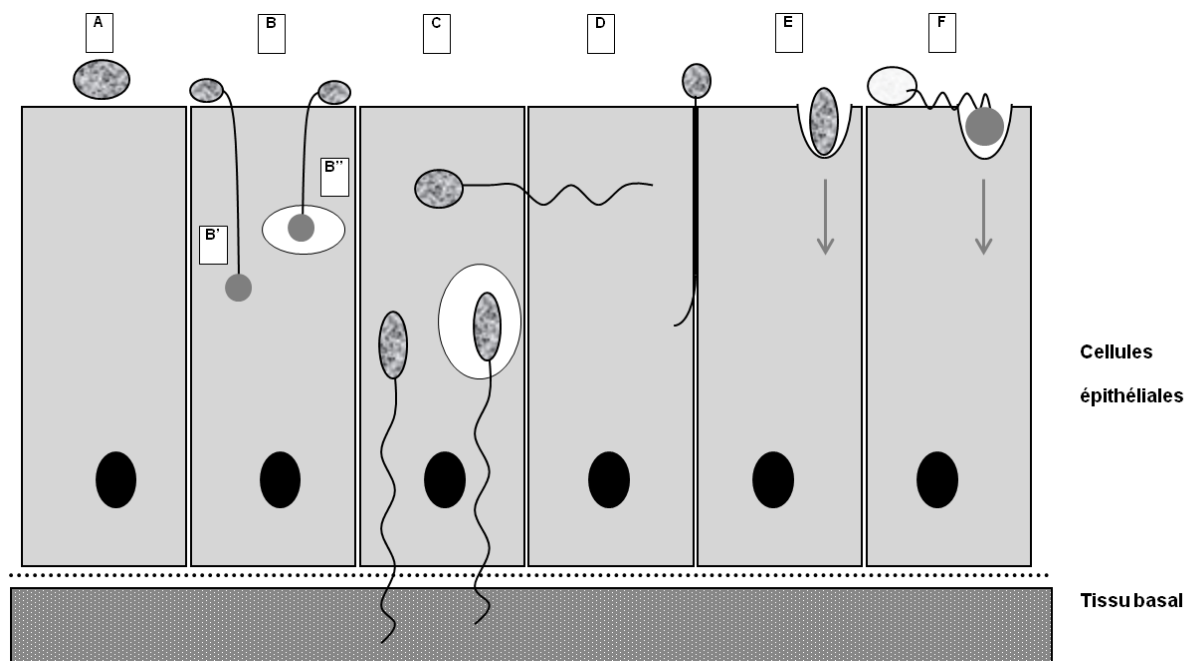


Figure 15 : Schéma des différentes hypothèses d'entrée du matériel infectieux dans une cellule-hôte. L'adhésion de la spore (A) est suivie de la dévagination du tube polaire (B) et la pénétration du parasite par la partie apicale de la cellule cible. Deux cas sont possibles : le sporoplasme est libre dans le cytoplasme de la cellule (B'), ou il est contenu dans une vacuole parasitophore (B''). Des spores intracellulaires peuvent infecter une cellule voisine ou un autre tissu *via* leur tube polaire (C). La pénétration basolatérale pourrait se faire par insinuation du tube polaire au niveau des jonctions intercellulaires (D). Une internalisation par endocytose directe de la spore (E) ou du sporoplasme (F) est aussi envisagée. (Adapté de Vivarès and Méténier, 2001)

II.C.3.2. L'élément infectieux : le sporoplasme

Le sporoplasme est la totalité de l'entité infectieuse qui pénètre dans la cellule-hôte lors de l'infection. Il est constitué du (ou des) noyau(x), du polaroplasme et des composants cytoplasmiques, mais sans le tube polaire. Comme toutes les microsporidies, le cytoplasme de *N. ceranae* se caractérise par une très grande richesse en ribosome et par l'absence de mitochondrie ou de peroxysome, avec des éléments membranaires pouvant être qualifiés de réticulum endoplasmique rugueux. Chez certaines microsporidies comme *Glugea stephani* ou *Nosema grylli*, des activités enzymatiques spécifiques de l'appareil de Golgi ont été identifiées dans le sporoplasme au niveau de structures vésiculaires et tubulaires, ce qui confirme l'existence d'un appareil de Golgi atypique sans saccules (Takvorian et Cali, 1994; Sokolova *et al.*, 2001a et 2001b). Selon l'espèce, deux types de conformations nucléaires existent : monocaryotique ou diplocaryotique. Dans ce dernier cas, qui concerne *N. ceranae*, les deux noyaux accolés se divisent de façon synchrone pour former un diplocaryon (Vavra, 1976a).

II.C.3.3. Germination sporale et internalisation du parasite

Chez *N. ceranae*, le mécanisme par lequel le sporoplasme envahit la cellule-hôte demeure inconnu, mais c'est aussi le cas pour les microsporidies en général. En effet, il est depuis longtemps sujet à débat et plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer l'invasion cellulaire (**Figure 15**).

L'hypothèse classique pour la pénétration du parasite fait intervenir le tube polaire qui jouerait le rôle de l'aiguille d'une seringue. Des constituants présents au niveau de la paroi de la spore pourraient être impliqués dans une éventuelle reconnaissance tissulaire (Bohne *et al.*, 2000) et dans l'initiation du processus d'invasion. La nature de ces interactions n'est pas connue mais elles pourraient être le stimulus qui, au contact du tissu épithélial, déclencherait un influx d'eau dans la spore et induirait l'augmentation de la taille de la vacuole postérieure, ce qui conduirait à l'augmentation de la pression osmotique intrasporale. Cet accroissement de pression provoquerait l'extrusion rapide du tube au niveau du capuchon polaire (Frixione *et al.*, 1992). Deux origines possibles à cette augmentation de pression osmotique sont proposées : d'une part la création d'un gradient de protons à partir de l'environnement alcalin autour de la spore (Dall, 1983), ou bien la conversion des réserves de tréhalose en glucose (Undeen et Vander Meer, 1999). Il a aussi été montré que des flux d'ions Ca^{2+} joueraient un rôle dans la dévagination du tube polaire (Pleshinger et Weidner, 1985). Grâce à l'inertie de sa dévagination, le tube polaire traverse la membrane plasmique de la cellule hôte et le

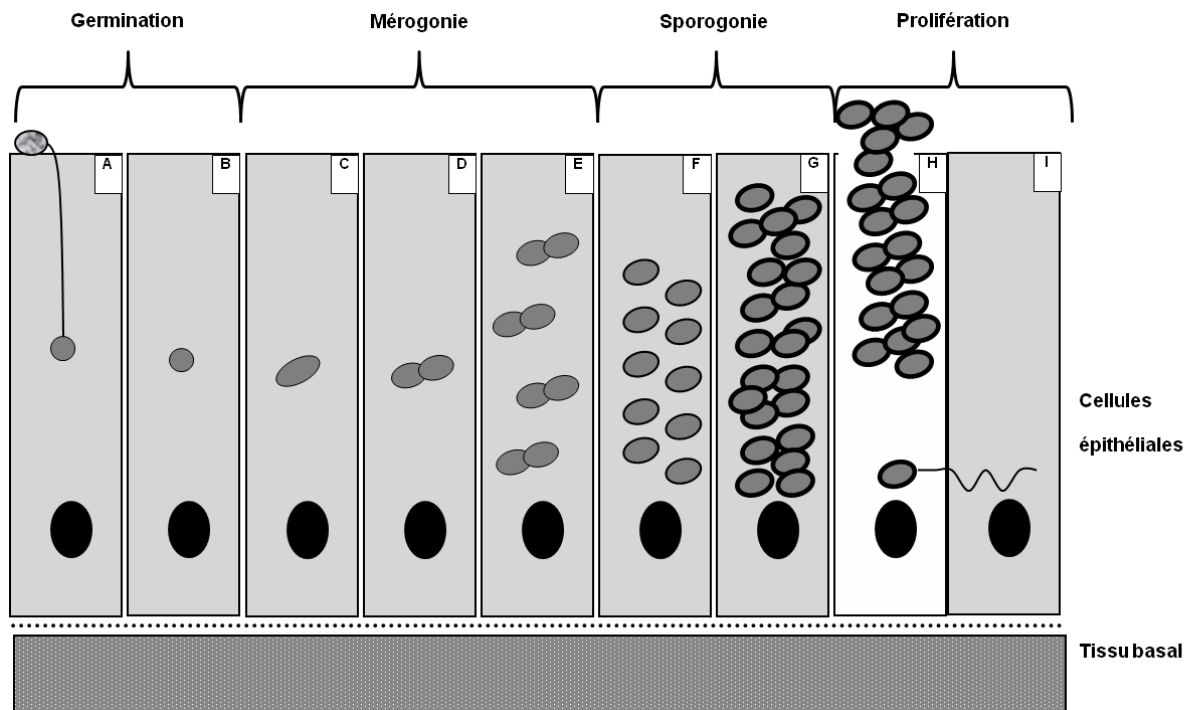


Figure 16 : Schéma du cycle de vie de *N. ceranae* dans une cellule intestinale. La germination est l'étape d'internalisation du parasite (A et B). S'en suit une période de multiplication intracellulaire (mérogonie, C, D et E), une phase de différenciation intracellulaire (sporogonie, F et G) amenant à la formation des spores et enfin, une phase de prolifération du parasite, caractérisée par une libération extracellulaire (H) ou une invasion directe de cellules adjacentes par les spores néoformées (I).

sporoplasme transite au travers du tube jusqu'au cytoplasme de la cellule hôte dans lequel il va (1) être libéré (c'est le cas chez *N. ceranae*) ou (2) demeurer au sein d'une vacuole parasitophore formée simultanément. Les membranes nécessaires au transfert du sporoplasme ainsi que la membrane plasmique seraient fournies par le polaroplaste (**Figure 15A à 15D**).

D'autres modèles ont été proposés pour expliquer le processus invasif car les données expérimentales ne concordent pas toujours avec le modèle classique d'invasion cellulaire. En effet, la vélocité du tube polaire lors de sa dévagination pourrait ne pas être suffisante pour lui permettre de traverser la membrane plasmique de la cellule hôte. Des auteurs ont ainsi proposé une internalisation de la spore ou du sporoplasme par endocytose (Foucault et Drancourt, 2000) (**Figure 15E et 15F**).

II.C.4. Multiplication intracellulaire et prolifération

Le cycle intracellulaire de *N. ceranae* est mal connu. Les quelques photographies d'intestins infectés où les stades du cycle sont reconnaissables ont permis de distinguer deux stades intracellulaires: la prolifération cellulaire (mérogonie) et la différenciation cellulaire (sporogonie). Le parasite est en contact direct avec le cytoplasme de la cellule hôte (il n'est pas localisé dans une vacuole parasitophore).

II.C.4.1. La mérogonie

Dans cette étape, le sporoplasme parasitaire se multiplie par fission binaire dans le cytoplasme d'une cellule hôte, ayant comme résultat la formation de mérontes appariés qui vont eux-mêmes continuer à se diviser. Cette caractéristique a été expérimentalement observée chez *N. ceranae* (**Figure 16C, 16D et 16E**) (Fries *et al.*, 1996; Vavra et Larsson, 1999 ; Higes *et al.*, 2010). La multiplication du parasite élargit les cellules hôtes et déplace les noyaux en position apicale; de nombreuses mitochondries sont placées autour des mérontes, ce qui facilite probablement l'obtention de molécules d'ATP dont le parasite a besoin (Higes *et al.*, 2010).

II.C.4.2. La sporogonie

La transition avec la sporogonie (marquant ainsi la fin de la phase de prolifération) s'effectue lorsque les mérontes appariés vont se séparer et se développer en sporontes. En théorie, la formation d'une membrane épaisse plus dense aux électrons sera observable en microscopie (Gisder *et al.*, 2010). Les sporontes sont de formes allongées et vont s'arrondir

durant leur développement. Parallèlement, le contenu cellulaire va commencer à s'organiser et la paroi va poursuivre son épaississement. Finalement, les sporontes subissent une division cellulaire conduisant à la formation des sporoblastes. Ceux-ci sont caractérisés par le début de la formation du tube polaire, jusqu'alors indifférencié, et par l'accroissement de la complexité cytoplasmique. Ce dernier stade ne se divisera plus. Il poursuit sa maturation par le développement complet de la paroi sporale, résultant ainsi en une spore mature (**Figure 16F et 16G**).

II.C.4.3. Prolifération sporale

Après trois jours d'infection, des parasites en formations sont visibles dans quelques cellules épithéliales. A six jours, la plupart des cellules en contiennent et des spores matures commencent à apparaître. Il a été suggéré que deux types de spores matures pourraient se développer. Les spores primaires, rondes et de paroi fine, seraient capables d'infecter les cellules hôtes voisines (**Figure 16I**) (Higes *et al.*, 2010). Les spores dites de résistance, ovales et de paroi plus épaisse, seraient libérées dans le lumen de l'intestin lorsque la cellule hôte se lyse (**Figure 16H**) (Wittner et Weiss, 1999 ; Gisder *et al.*, 2010).

Le mécanisme à l'origine du relargage des spores dans la lumière du tube n'est pas clairement défini. Il pourrait s'agir d'une expansion trop volumineuse du parasite qui ferait mécaniquement éclater la cellule. Une seconde possibilité serait que les microsporidies profiteraient du turn-over des cellules intestinales afin d'être libérées dans la lumière de l'intestin lorsque les cellules sont dégradées. Il a été très récemment montré que les individus infectés par *N. ceranae* étaient moins sujet à une apoptose induite que les sujets sains, laissant penser que le parasite serait capable d'inhiber l'entrée des cellules en apoptose (Higès *et al.*, 2013). Au bout de 10 à 12 jours, les spores seront très présentes dans les fèces des abeilles, facilitant les infections inter-individus et un relargage dans l'environnement.

II.D. Caractéristiques d'une infection par *N. ceranae*

Etant donné la difficulté de repérer clairement les symptômes d'une infection par *N. ceranae*, des outils de diagnostics ont été développés afin de détecter le parasite tout en le différenciant de *N. apis*.

II.D.1. Diagnostic

Le diagnostic des microsporidioses est généralement basé sur l'observation des spores dans les échantillons biologiques puis, différentes approches peuvent être employées afin de caractériser l'espèce incriminée dans la maladie (Didier et Weiss, 2006).

II.D.1.1. Microscopie

Une approche classique est l'observation des spores en microscopie, qu'elle soit optique, à contraste de phase, ou électronique. Lors des premières études sur le sujet, la différenciation entre *N. ceranae* et *N. apis* n'avait pas pu être clairement établie (Fries *et al.*, 2006). Néanmoins, les différences ultrastructurales des deux espèces sont maintenant connues, et la différenciation peut se faire *via* microscopie électronique à transmission grâce au dénombrement des enroulements du tube polaire ou de la taille des spores (Fries, 2010).

II.D.1.2. Biologie moléculaire

Des approches moléculaires basées sur l'amplification par PCR des gènes codant les ARNr des sous-unités du ribosome assurent une discrimination suffisante entre espèces. La séquence de l'ARNr de la petite sous-unité permet même la détection simultanée de *N. ceranae* et *N. apis* au sein d'un même échantillon (Martin-Hernandez *et al.*, 2007). Avec cette méthode, le seuil de détection pour les microsporidies est d'environ 10^2 spores/gramme de fèces (contre 10^4 à 10^6 pour la microscopie électronique), mais il est impossible de faire de quantification. Depuis quelques années d'autres marqueurs moléculaires, codant des protéines, ont été développés pour différencier les microsporidies (Cf. **Chapitre III**). De même, la PCR quantitative permet depuis peu le diagnostic des microsporidioses avec un seuil de détection très bas (de 500 pg/L à 50 pg/L d'ADN) même en multiplex (Bourgeois *et al.*, 2010).

II.D.2. Atteinte à l'échelle individuelle

Ce qui inquiète principalement le monde apicole quant à la présence de *N. ceranae* dans les colonies d'abeilles est que le parasite a été relié à des effondrement de colonies (Higès *et al.*, 2007). Lors d'une infection, les abeilles présentent une dégénérescence des tissus épithéliaux de l'intestin moyen dès la première semaine d'infection (Higès *et al.*, 2007). Il a également été montré que le parasite induit un stress énergétique (Martin-Hernandez *et al.*, 2011b), inhibe la production de transcrits impliqués dans l'immunité (Antunez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012; Dussaubat *et al.*, 2012) et modifie la production d'enzymes

gérant le cycle de vie des abeilles, leur changement d'activité et leur comportement (Goblirsch *et al.*, 2013). De plus, le parasite réduirait en moyenne de 9 jours la durée de vie des individus infectés (Goblirsch *et al.*, 2013). En agissant ainsi sur la physiologie, la survie et le comportement des abeilles, *N. ceranae* induit des changements radicaux sur le développement et l'équilibre de la colonie, pouvant l'amener à s'effondrer.

II.D.3. Thérapie

La recherche de substances anti-microsporidiennes se heurte à de nombreuses difficultés en raison du développement intracellulaire des parasites, de la résistance de la paroi sporale, et de la faible connaissance de leur métabolisme. Deux molécules sont principalement utilisées en traitement : l'albendazole, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules et donc de la division cellulaire, et la fumagilline, un inhibiteur d'une l'aminopeptidase de type II, mais dont la génotoxicité limite leur utilisation systémique (Tremoulet *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). En marge de ces deux molécules existe aussi le Nitazoxanide, un anti-protozoaire à large spectre qui inhibe l'action de la pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFOR) du système de transport d'électrons (Grob, 2003). Néanmoins, d'autres voies thérapeutiques sont à l'essai (Anane et Attouchi, 2010), utilisant des dérivés de la fumagilline (TNP-470) moins toxiques ou des niveaux non toxiques d'antibiotiques comme l'ovalicine ou des fluoroquinolones qui pourraient être utilisés conjointement à la fumagilline. Il a été montré récemment que *N. ceranae* pourrait échapper à l'action de cette dernière (Huang *et al.*, 2013), ce qui met en évidence le besoin de rechercher d'autre molécules.

II.E. Rôle incertain dans les effondrements de colonies

Malgré l'absence de symptômes de nosémose, il a été montré que la présence de *N. ceranae* dans des ruches peut provoquer des phases cliniques notables amenant progressivement à une forte diminution du nombre d'individus dans la colonie, et ce, jusqu'à son effondrement total (Higes *et al.*, 2008b). A partir de ce moment, de nombreuses études traitant de l'effet de *N. ceranae* sur la mortalité des abeilles ont été publiées (revues dans Higes *et al.*, 2013), ainsi que sur la relation entre le parasite et les effondrements des colonies. Néanmoins, ces études relèvent des taux de mortalités rarement similaires et ne démontrent par forcément une telle association entre *N. ceranae* et les effondrements de colonies. Cox-Foster *et al.* (2007) ont observé que, si *N. ceranae* peut être détecté dans toutes les colonies atteintes de CCD, le parasite est aussi largement présent dans les colonies ne présentant pas

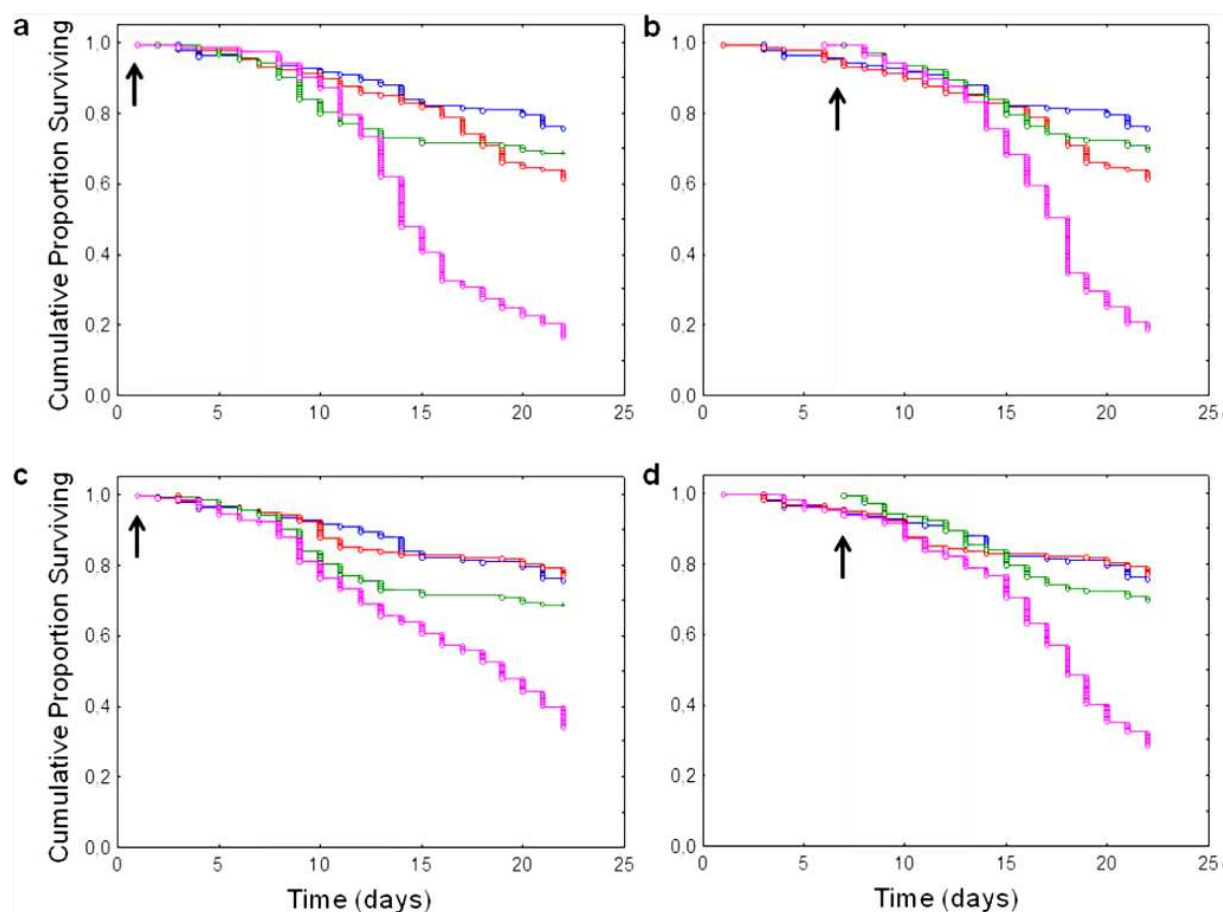


Figure 17 : Effets de la combinaison *N. ceranae* - fipronil sur la survie d'abeilles. Les données représentent la proportion cumulée d'abeilles survivantes après avoir été exposées à *Nosema ceranae* (rouge), au fipronil (vert), aux deux facteurs de stress (rose). Les courbes en bleu correspondent aux abeilles non infectées et non intoxiquées. Différentes séquences de traitement ont été testées (a, b, c et d) : les flèches indiquent le jour de l'infection par le parasite, et le fond gris représente les 7 jours d'exposition au pesticide. Les courbes en rose montrent un effet synergique délétère lorsque les deux traitements sont combinés, et ce quel que soit leur ordre d'application. (D'après Aufauvre *et al.*, 2012)

les symptômes du syndrome. De même, en suivant 220 ruches pendant 5 ans, Gisder *et al.* (2010) n'ont pas observé de lien entre la présence de *N. ceranae* et des mortalités ou des disparitions d'abeilles.

Le rôle de *N. ceranae* dans le déclin des abeilles apparaît donc discutable et il semble donc que la virulence du parasite soit variable d'un individu à un autre, et d'une colonie à une autre (Higès *et al.*, 2010). Pour expliquer ce phénomène, deux hypothèses majeures et non exclusives peuvent être proposées, mais elles nécessitent d'être validées ou infirmées.

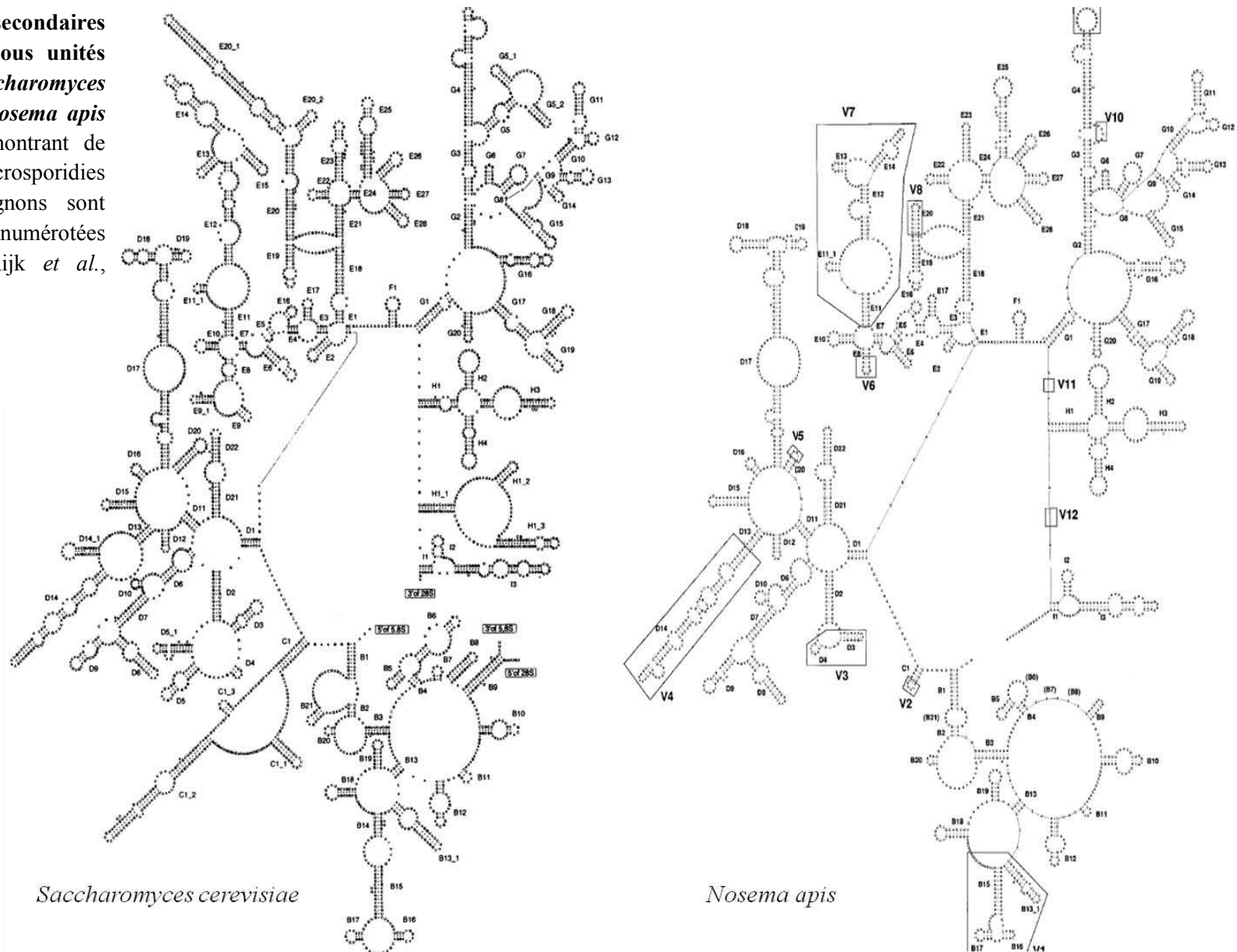
➔ **L'environnement du parasite influencerait son développement et/ou sa stratégie de pathogénicité.**

Cet environnement comprend à la fois l'hôte dans lequel il se développe et les conditions environnementales qui peuvent impacter les interactions hôte-parasite. D'une part, le fond génétique de l'abeille pourrait ainsi influencer le pouvoir pathogène du parasite. La prévalence de *N. ceranae* semble, par exemple, plus faible chez les *Apis* orientales (*A. cerana*, *A. dorsata* et *A. florea*) que chez *A. mellifera*, Chaimanee *et al.* (2010), suggérant qu'une telle hypothèse est à approfondir. Notre équipe a comparé la susceptibilité de trois taxa d'*A. mellifera* à une infection par *N. ceranae* et a montré que, s'il existe un effet du fond génétique des abeilles, celui-ci reste plus faible que l'effet de l'historique des colonies (Fontbonne *et al.*, 2013). D'autre part, il est connu que les microsporidies sont des parasites opportunistes, c'est-à-dire qu'ils profitent d'une atteinte de l'organisme cible pour pouvoir mieux se développer. *N. ceranae* pourrait profiter d'une baisse des défenses de l'abeille due à un autre stress (pathogène, contaminant, ressources). *N. ceranae* peut par exemple agir en synergie avec des doses pourtant faibles de certains pesticides tels que le fipronil ou le thiaclopride sur la mortalité des abeilles (**Figure 17**) (Alaux *et al.*, 2010 ; Vidau *et al.* 2011 ; Aufauvre *et al.*, 2012).

➔ **Le fond génétique du parasite influencerait son pouvoir pathogène.**

Il a été proposé que la variation de la virulence de *N. ceranae* puisse être liée à l'existence de différents variants parasitaires (Medici *et al.*, 2011). En effet, ces auteurs ont montré qu'il existait plusieurs haplotypes de la séquence du SSUrDNA dans leurs échantillons, et se sont demandés si cette variété d'haplotypes se manifestait par l'existence de différentes souches de *N. ceranae* dont le niveau de virulence dépendrait de son background génétique. Pour tester cette hypothèse, il faut être en mesure de différencier puis d'isoler des souches de *N. ceranae*.

Figure 18 : Structures secondaires des ARNr des grandes sous unités ribosomiques de *Saccharomyces cerevisiae* (à gauche) et *Nosema apis* (à droite). Les régions montrant de fortes variations chez les microsporidies par rapport aux champignons sont indiquées par des boîtes numérotées (V1-V12) (D'après De Rijk *et al.*, 1994 ; De Rijk *et al.*, 1998)



III- Génomique chez les microsporidies

Certains auteurs ont émis l'hypothèse que la mortalité des abeilles infectées par *N. ceranae* dans les études espagnoles serait associée à une plus grande virulence de la souche parasitaire étudiée (Genersch, 2010; Higès *et al.*, 2013). En effet, les plus fortes mortalités européennes attribuées à *N. ceranae* ont été décrites en Espagne, alors que la relation parasite-mortalité n'a pas pu être établie ailleurs (Higès *et al.*, 2007; Gisder *et al.*, 2010; Stevanovic *et al.*, 2010). Afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse de l'existence de différentes souches de *N. ceranae*, il est indispensable de pouvoir discriminer des variants moléculaires du parasite. Les techniques de biologie moléculaire ont permis d'identifier chez différents pathogènes, y compris chez certaines microsporidies, des génotypes spécifiques de zones géographiques ou d'hôtes. La classification actuelle des microsporidies a elle-même largement été basée sur l'utilisation de méthodes moléculaires utilisant les séquences de gènes codant des ARNr et/ou des protéines. Dans ce chapitre seront présentés les différents marqueurs moléculaires principalement utilisés chez les microsporidies, en se concentrant plus particulièrement sur les espèces du genre *Nosema* et autant que possible sur l'espèce infectant les abeilles, *N. ceranae*.

III.A. Les gènes codant les ARN ribosomaux

Les gènes codant les ARNr, appelés ADNr, ont une place primordiale dans l'étude de l'évolution et de l'écologie microbienne. Leur ubiquité, leur extrême conservation de séquence avec des domaines structuraux à taux d'évolution variables (Woese, 1987), en ont fait les marqueurs les plus couramment utilisés pour l'identification des espèces et de leurs souches, ainsi que pour les études de phylogénie.

III.A.1. Caractéristiques des ADNr chez les microsporidies

Dans une optique de typage intraspécifique, les analyses moléculaires basées sur les séquences des ADNr sont limitées chez les microsporidies (Ironsides, 2007), du fait de la réduction dans la taille de leur séquence par rapport aux autres eucaryotes (Cf. Chapitre II), et du manque de certaines régions variables couramment utilisées en phylogénie (Vossbrinck, 1987). En effet, il a été montré qu'il existe une importante réduction des ARNr microsporidiens, et qu'elle a lieu dans des régions qui varient selon les espèces (**Figure 18**)

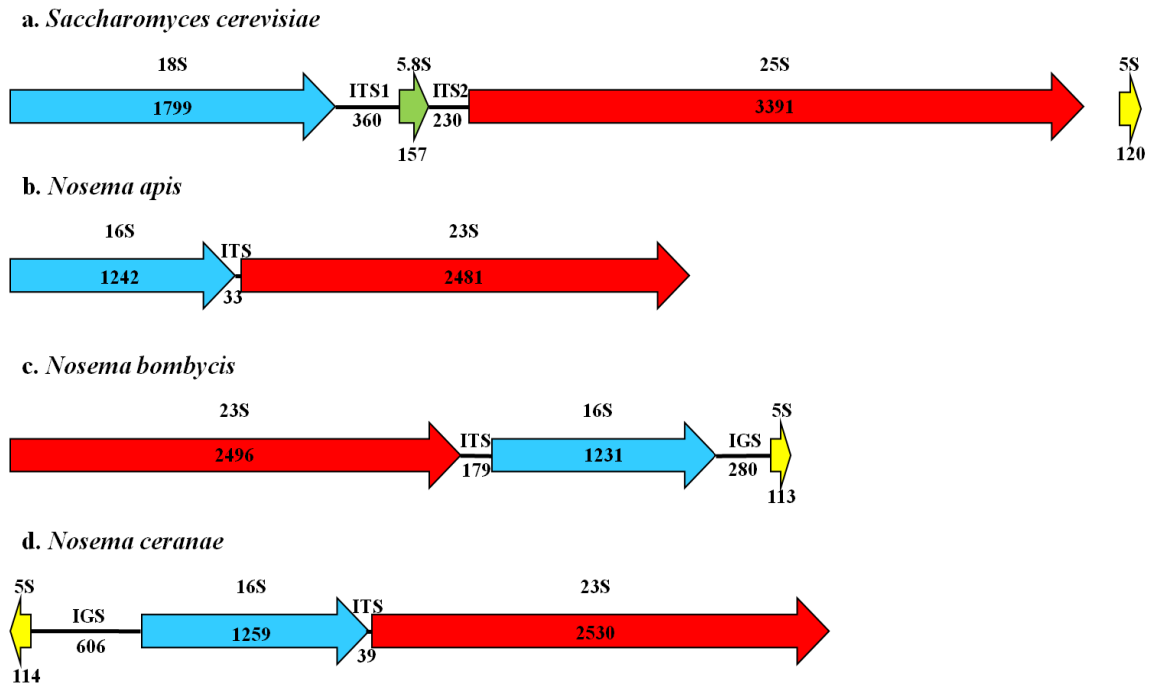


Figure 19: Locus ADNr chez *Saccharomyces cerevisiae* (a) et trois espèces microsporidiennes du genre *Nosema* : *N. apis* (b), *N. bombycis* (c) et *N. ceranae* (d). Les microsporidies ont des séquences codant les ARNr plus courtes que celles des autres eucaryotes tels que la levure *S. cerevisiae* (a). Leurs coefficients de sédimentation se rapprochent de ceux des procaryotes. L'organisation des unités transcriptionnelles des gènes est variable chez les microsporidies, avec au moins trois organisations différentes retrouvées sein du genre *Nosema* selon l'ordre et le sens des régions codantes (b, c, d). La présence du gène de l'ARNr 5S sur le locus chez *Nosema apis* est incertaine. (d'après Gatehouse and Malone, 1998 ; Chen *et al.*, 2013)

(Peyretailade *et al.*, 1998b; De Rijk *et al.*, 1998). Ainsi, les séquences codent principalement les éléments universels certainement essentiels à la fonction de traduction dans le ribosome assemblé. Du fait de cette caractéristique, les alignements de séquences d'espèces proches contiennent souvent trop peu d'informations spécifiques pour assigner des topologies correctes aux arbres phylogénétiques associés (Vossbrinck et Debruner-Vossbrinck, 2005).

III.A.1.1. Organisation variable des unités transcriptionnelles

Chez la plupart des eucaryotes y compris chez les champignons non-microsporidiens, les unités transcriptionnelles codant les ARN ribosomiques sont organisées dans l'ordre suivant : 18S - 5.8S - 28S, avec des régions intergéniques transcrites (ITS pour internal transcribed spacer) entre le 18S et le 5.8S (ITS1) et entre le 5.8S et le 28S (ITS2) (**Figure 19**) (Ironsides, 2007), le gène codant l'ARNr 5S se trouvant à l'extérieur de ce locus. A noter que les coefficients de sédimentation peuvent varier selon les espèces (*Saccharomyces cerevisiae* possède par exemple une grande sous-unité de 25S). Chez les microsporidies, l'ARNr 18S (codé par le gène SSUrDNA pour rDNA small subunit) est réduit à la taille d'un ARNr procaryotique 16S. Les ARNr 5.8S et 28S sont eux réduits et fusionnés en un ARNr de 23S (gène LSurDNA pour rDNA large subunit) (Peyretailade *et al.*, 1998b). Les deux gènes SSUrDNA et LSurDNA sont cependant toujours organisés dans une même unité transcriptionnelle, avec en revanche un seul ITS. Comme chez les autres eucaryotes, le gène codant l'ARNr 5S ne se trouve généralement pas dans le même locus, ni dans un environnement chromosomique proche (Peyretailade *et al.*, 1998b). *N. apis* et *N. bombycis* présentent ce type d'organisation (**Figure 19**) bien que la localisation du 5S dans le même locus a été suggérée mais remise en question (Gatehouse et Malone, 1998; Tay *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2013).

Chez *N. bombycis*, cette unité présente une organisation différente, avec le LSurDNA localisé en amont du SSUrDNA. De plus, le gène codant l'ARNr 5S est situé sur le même locus, en aval de l'unité précédente, de laquelle il est séparé par une région intergénique (IGS pour intergenic spacer) (**Figure 19**) (Huang *et al.*, 2004). Cette organisation se retrouve chez d'autres espèces du genre *Nosema*, comme *Nosema spodopterae*, *Nosema plutellae* et *Nosema antheraeae*, tous parasites de lépidoptères et phylogénétiquement proches de *N. bombycis* (Tsai *et al.*, 2005; Wang et Chen, 2006; Ironsides, 2007). Fait unique à ce jour, certains isolats de *N. bombycis* possèdent des allèles où le SSUrDNA est fragmenté en deux régions par une région non codante (Iiyama *et al.*, 2004). Ces unités sont néanmoins transcriptionnellement actives mais coexistent avec des allèles non fragmentés au sein du même génome.

Chez *N. ceranae*, le locus présente aussi un arrangement spécifique. Le gène de l'ARNr 5S se trouve en amont de l'unité SSUrDNA-ITS-LSUrDNA, de laquelle il est séparé par un IGS (**Figure 19**) (Huang *et al.*, 2008). De plus, l'ITS, classiquement utilisé en génotypage, est très court chez ce parasite. Ces différentes organisations ont longtemps posé problème pour placer les *Nosema* dans l'arbre phylogénétique des microsporidies, mais aussi dans l'organisation même des espèces au sein du cluster des *Nosema* (Choi *et al.*, 2011).

III.A.1.2. Multiplicité des loci des ADNr

Les loci codant les ARNr sont présents en multiples copies dans les génomes microsporidiens, existant le plus souvent sous forme de répétitions en tandem, séparées par un IGS (discuté par Gatehouse et Malone, 1998). Chez les *Nosema*, *N. apis* est la seule espèce pour laquelle de telles répétitions ont été mises en évidence (Gatehouse et Malone, 1998). Chez *N. bombycis*, de nombreuses copies ont été détectées sur différents chromosomes du génome, mais leur organisation n'est cependant pas connue (Liu *et al.*, 2008).

Chez la plupart des organismes, les copies des ADNr sont soumises à une évolution concertée amenant à l'homogénéisation de leurs séquences et prévenant ainsi le maintien simultané de plusieurs allèles (Dover *et al.*, 1981 ; Nei et Rooney, 2005). Chez *E. cuniculi*, 22 copies du locus ADNr ont été identifiées sur des régions télomériques du génome. Ce locus a permis de génotyper des souches parasitaires (Didier *et al.*, 1995), et aucune diversité de séquence n'a été mentionnée dans les études publiées (Selman *et al.*, 2013). Singulièrement, les *Nosema* spp. semblent posséder plusieurs copies des ADNr pouvant présenter des variations intragénomiques (Gatehouse *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2008; Cornman *et al.*, 2009). Chez *N. bombi*, il a clairement été montré qu'il existe plusieurs copies variables du locus des ADNr dans une seule et même spore (O'Mahony *et al.*, 2007). Une éventuelle perte d'évolution concertée de ce marqueur ne serait donc pas générale aux microsporidies.

III.A.2. Génotypage chez les microsporidies

Le génotypage (différenciation de taxons) basé sur les caractères génétiques, a permis la reclassification des microsporidies dans l'arbre du vivant, ainsi que la réorganisation des branches au sein du phylum *Microsporidia* (Vossbrinck et Debrunner-Vossbrinck, 2005). Malgré leurs originalités structurelles, les ADNr sont les gènes les plus souvent utilisés pour évaluer la diversité génétique entre espèces, mais aussi entre isolats microsporidiens provenant d'hôtes et/ou de localisations différentes, ils permettent parfois même de définir des

souches parasites. Vossbrinck et Debrunner-Vossbrinck (2005) ont montré que la séquence du SSUrDNA devait être préférentiellement utilisée pour les études inter-espèces, puisque plusieurs tentatives d'amplifications de la séquence du LSUrDNA n'ont pas abouti et que la séquence de la région ITS semble variable au sein même d'une espèce. En revanche, lorsqu'on veut différencier des souches parasites appartenant à une même espèce, cette dernière séquence se révèle alors un atout majeur en tant que marqueur moléculaire.

Les régions intergéniques sont intéressantes pour la discrimination intra-spécifique car moins soumises à la sélection, elles évolueraient plus rapidement que les régions codantes et reflèteraient donc mieux la diversité de séquence au sein d'une population. La séquence des ITS a ainsi été proposée pour servir de « code-barres » moléculaire chez les champignons (Scoch *et al.*, 2012). Cependant, chez les microsporidies, les différentes organisations du locus ADNr rendent impossible l'amplification des ITS et IGS avec un unique couple d'amorces (Ironsides, 2013). Toutefois, l'utilisation d'amorces alternatives prenant en compte l'organisation du locus a permis d'étudier ces régions chez certains groupes microsporidiens (Huang *et al.*, 2008 ; Santin *et al.*, 2009; Sak *et al.*, 2011 ; Wilkinson *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2012). Chez quelques espèces, la détermination de souches parasites a même été possible. L'étude de l'IGS d'*E. cuniculi* et de l'ITS d'*E. hellem* et d'*E. bienewsi* a ainsi permis de distinguer respectivement 3, 4 et 4 souches au sein de ces espèces (Didier *et al.*, 1995 ; Liguory *et al.*, 1998; Mathis *et al.*, 1999). Souvent, le polymorphisme est lié à une différence dans le nombre de répétitions de courts motifs sur ces séquences. Chez *E. cuniculi* par exemple, la séquence 5'-GTTT-3' contenues dans l'IGS est répétée 3 fois dans la souche de type I, 2 fois dans la souche de type II et 4 fois dans la souche de type III (Didier *et al.*, 1995).

III.A.3. Génotypage chez *Nosema ceranae*

Les différentes études menées chez *N. ceranae* montrent que les méthodologies précédentes ne sont pas applicables à cette espèce. Huang *et al.* (2008) ont comparé les régions intergéniques (IGS et ITS) des ADNr d'isolats du parasite provenant de différents hôtes (4 isolats d'*A. mellifera* et 2 isolats d'*A. cerana*) et de différentes régions (3 isolats de Taïwan, 1 de France, 1 d'Espagne et 1 de Martinique). La taille de l'ITS est fortement réduite chez *N. ceranae*: 39 pb contre 179 pb et 243 pb pour *N. bombycis* et *E. bienewsi* respectivement (**Figure 19**), mais n'est pourtant pas si différente de celles de *E. cuniculi* et *E. hellem*, longues de 42 pb et 45 pb respectivement. Si la séquence de l'ITS permet de différencier *N. ceranae* d'espèces phylogénétiquement proches comme *N. bombycis* et *N.*

| | | |
|---|---|--|
| <i>Nosema bombi</i> DQ472177 | : | TCA-----GGAAGTATAA-----GTTTGTTTGTATGTC |
| <i>Nosema apis</i> U97150 | : | CGA-----AGATTGCAATTIT--TAGAATTAGTTTTATA |
| <i>Nosema apis</i> Spain | : | CGA-----AGATTACAATTIT--TAGAATTAGTTTTATA |
| <i>Nosema</i> sp. France | : | CAAS-----ATATTATTTT-TIT--AGAATT--TTAAA- |
| <i>Nosema ceranae</i> Martinique Island | : | TCATTTTTTAAAATTATTTATITCGTATTATTATTTTTAT- |
| <i>Nosema ceranae</i> France | : | TCATTTTTTAAAATTATTTATITCAATATTATTATTTTTAT- |
| <i>Nosema ceranae</i> Spain | : | TCATTTTTTAAAATTATTTATITCAATATTATTATTTTTAT- |
| <i>Nosema ceranae</i> Taiwan | : | TCATTTTTTAAAATTATTTATITCAATATTATTATTTTTAT- |
| <i>Nosema ceranae</i> Taiwan Domestied | : | TCATTTTTTAAAATTATTTATITCAATATTATTATTTTTAT- |
| <i>Nosema ceranae</i> Taiwan A. cerana | : | TCATTTTTTAAAATTATTTATITCAATATTATTATTTTTAT- |

Figure 20: Alignement des séquences de l'ITS d'isolats de *N. ceranae*, *N. apis* et *N. bombi*. L'ITS de *N. ceranae* diffère de celui des deux autres espèces mais il est trop court pour être utilisé pour des approches de diversité. En effet, une seule variation nucléotidique, une transition chez l'isolat provenant de Martinique (G à la place de A), a été observée entre les 6 isolats étudiés (D'après Huang *et al.*, 2008).

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| Alemania | CGACGATGTG | A-TATG-AAA | ATATTAATTT | GATTACAT- | AATAGAAATT | TGAGTTTTTT |
| Francia | CGACGATGTG | A-TATGGAAA | ATATTAATTT | GATTACAT- | AATAGAAATT | TGAGTTTTTT |
| Canada | CGACGATGTG | A-TATG-AGA | ATATTAATTT | GATTACAT- | AATAGAAATT | TGAGTTTTTT |
| Madariaga | ----- | ----- | -----CTT | GATACTA- | -ATAGAAATT | -GAGTTTTTT |
| Delta | ----- | ----- | -----CTT | GATACTAT- | AATAGAAATT | TGAGTTTTTT |
| Ayacucho | ----- | ----- | -----CCC | TGATACAT- | AATAGAAATT | -GAGTTTTTT |
| Mar d Plata | ----- | ----- | -----CTT | GATAACATG | AATAGAAATT | TGAGTTTTTT |
| | | | | | | |
| Alemania | GGCTCTGGGG | ATAGTATGAT | CGCAAGATTG | AAAATTAAAG | AAATTGACGG | AAGAATACCA |
| Francia | GGCTCTGGGG | ATAGTATGAT | CGCAAGATTG | AAAATTAAAG | AAATTGACGG | AAGAATACCA |
| Canada | GGCTCTGGGG | ATAGTATGAT | CGCAAGATTG | AAAATTAAAG | AAATTGACGG | AAGAATACCA |
| Madariaga | GGCTCTGGGG | ATAGTATGAT | CGCAAGATTG | AAAATTAAAG | AAATTGACGG | AAGAATACCA |
| Delta | GGCTCTGGGG | ATAGTATGAT | CGCAAGATTG | AAAATTAAAG | AAATTGACGG | AAGAATACCA |
| Ayacucho | GGCTCTGGGG | ATAGTATGAT | CGCAAGATTG | AAAATTAAAG | AAATTGACGG | AAGAATACCA |
| Mar d Plata | GGCTCTGGGG | ATAGTATGAT | CGCAAGATTG | AAAATTAAAG | AAATTGACGG | AAGAATACCA |
| | | | | | | |
| Alemania | CAAGGAGTGG | ATTGTGCGGC | TTAATTTGAC | TCAACGCGAG | GTAACCTTACC | AATATTTTAT |
| Francia | CAAGGAGTGG | ATTGTGCGGC | TTAATTTGAC | TCAACGCGAG | GTAACCTTACC | AATATTTTAT |
| Canada | CAAGGAGTGG | ATTGTGCGGC | TTAATTTGAC | TCAACGCGAG | GTAACCTTACC | AATATTTTAT |
| Madariaga | CA--GGAGTGG | ATTGTGCGGC | TTAATTTGAC | TCAACGCGAG | GTAACCTTACC | AATATTTTAT |
| Delta | CA--GGAGTGG | ATTGTGCGGC | TTAATTTGAC | TCAACGCGAG | GTAACCTTACC | AATATTTTAT |
| Ayacucho | CA--GGAGTGG | ATTGTGCGGC | TTAATTTGAC | TCAACGCGAG | GTAACCTTACC | AATATTTTAT |
| Mar d Plata | CA--GGAGTGG | ATTGTGCGGC | TTAATTTGAC | TCAACGCGAG | GTAACCTTACC | CATATTTTAT |
| | | | | | | |
| Alemania | TATTTTGAGA | GAACGGTTTT | TTGTTTGAGA | ATGATAATAG | TGGTGCATGG | CCGTTTTCAA |
| Francia | TATTTTGAGA | GAACGGTTTT | TTGTTTGAGA | ATGATAATAG | TGGTGCATGG | CCGTTTTCAA |
| Canada | TATTTTGAGA | GAACGGTTTT | TTGTTTGAGA | ATGATAATAG | TGGTGCATGG | CCGTTTTCAA |
| Madariaga | TATTTTGAGA | GAACGGTTTT | TTGTTTGAGA | ATGA----- | ----- | ----- |
| Delta | TATTTTGAGA | GAACGGTTTT | TTGTTTGAGA | ATGA----- | ----- | ----- |
| Ayacucho | TATTTTGAGA | GAACGGTTTT | TTGTTTGAGA | ATGA----- | ----- | ----- |
| Mar d Plata | TATTTTGAGA | GAACGGTTTT | TTGTTTGAGA | ATGA----- | ----- | ----- |

Figure 21 : Alignement des séquences partielles du SSUrDNA de *Nosema ceranae*. Les cadres rouges entourent les nucléotides polymorphiques des séquences d'Argentine (Alemania, Madariaga, Delta, Ayacucho et Mar del Plata). Le cadre vert entoure les nucléotides distinguant les allèles d'Argentine de ceux récupérés sur Genbank (Allemagne, France et Canada). (D'après Medici *et al.*, 2011)

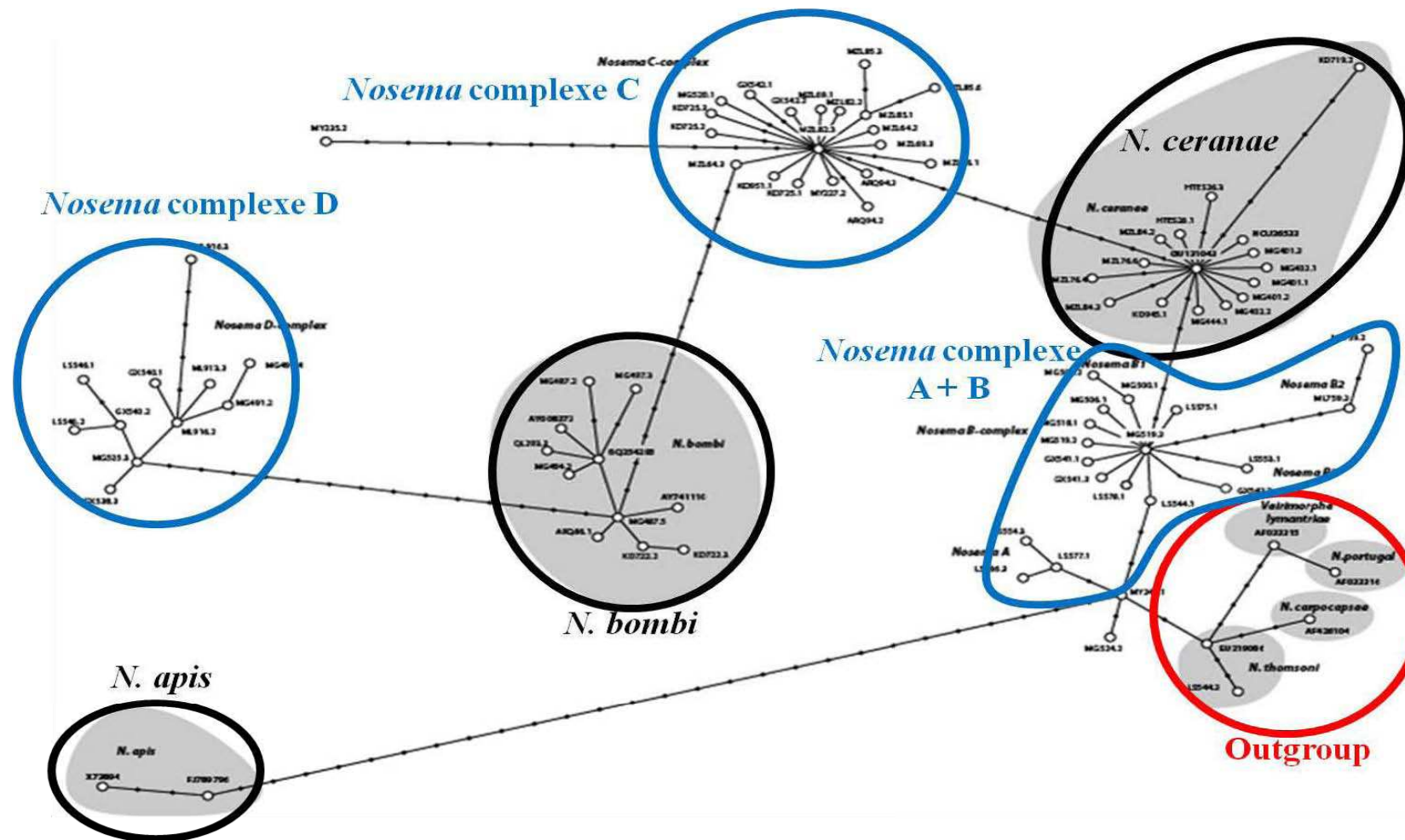


Figure 22: Réseau d'haplotypes du SSUrDNA d'isolats de *Nosema* spp. provenant de différentes espèces de bourdons (genre *Bombus*) prélevés en Chine. Le réseau, visualisé avec HapStar, connecte les haplotypes (cercles blancs) dont les séquences ont été obtenues à partir d'amplifications faites avec le même couple d'amorces. Le réseau est basé sur les différences de sites polymorphiques (indiquées par les points noirs) entre séquences prises deux à deux. Les zones grises correspondent aux haplotypes d'espèces connues et les groupes entourés en bleu à de nouveaux taxons. Les séquences de références (outgroup) sont entourées en rouge. (adapté de Li *et al.*, 2012).

apis, sa courte taille semble, dans ce cas, limiter la quantité d'information nécessaire pour évaluer un polymorphisme de séquence au sein de l'espèce. Ainsi, sur les 6 isolats, un seul nucléotide variable a été retrouvé dans l'ITS (**Figure 20**) et il serait donc hasardeux de conclure à une distinction de souches en se basant sur si peu d'information. L'IGS est lui beaucoup plus long, 606 pb contre 279 pb chez *N. bombycis*, mais présente un polymorphisme de séquence intra-isolat, ne permettant pas de définir un profil allélique spécifique à un isolat (Huang *et al.*, 2008). Il est donc difficile de conclure sur la validité de l'IGS en tant que marqueur moléculaire pour le génotypage.

Concernant les régions codantes, il a été montré que le SSUrDNA permet de différencier les espèces au sein du genre *Nosema* et de proposer de nouveaux clades parasites, comme dans le cas des *Nosema* parasitant les bourdons (*Bombus* spp.) en Chine (**Figure 22**) (Li *et al.*, 2012). En revanche, peu d'études ont évalué le polymorphisme des séquences du locus des ADNr. Williams *et al.* (2008) sont les premiers à avoir montré du polymorphisme dans un fragment de la séquence du 16S de *N. ceranae* chez *A. mellifera*. Si les 5 séquences qu'ils ont obtenues depuis différents isolats en Amérique du Nord sont identiques, elles diffèrent de celles provenant d'isolats de Chine ou d'Europe par l'insertion-délétion d'une purine. Les auteurs ont donc proposé l'existence d'haplotypes reposant sur des critères géographiques. Medici *et al.* (2011) ont également mis en évidence 3 allèles distincts d'un fragment du SSUrDNA dans des échantillons provenant de 38 régions d'Argentine (même si leur alignement en fait apparaître 4; **Figure 21**). Bien que très réduites, ces études indiquent l'existence de différents allèles du SSUrDNA de *N. ceranae* chez *A. mellifera*.

L'étude la plus complète, et spécifiquement destinée à évaluer la diversité génétique de *N. ceranae*, a porté sur un fragment couvrant l'IGS (615 pb) et une partie du SSUrDNA (560 pb) de 12 isolats parasites collectés dans différentes régions géographiques (Sagastume *et al.*, 2011). Ayant parfois séquencé plusieurs clones provenant d'un même échantillon, 79 haplotypes ont pu être détectés au sein des 105 séquences obtenues, démontrant une forte diversité de séquence du locus, qui se retrouve principalement au niveau de l'IGS. Étonnamment, aucun isolat, que ce soit un groupe d'abeilles ou même une abeille individuelle, n'a donné un unique haplotype, montrant qu'une diversité nucléotidique peut être parfois observée au sein d'un unique individu hôte. Par contraste, des haplotypes strictement identiques ont été retrouvés dans des isolats géographiquement éloignés. Sagastume *et al.* (2011) en concluent que leurs observations « indiquent clairement que le locus ADNr n'est pas un marqueur fiable pour la différenciation de souches de *N. ceranae* ».

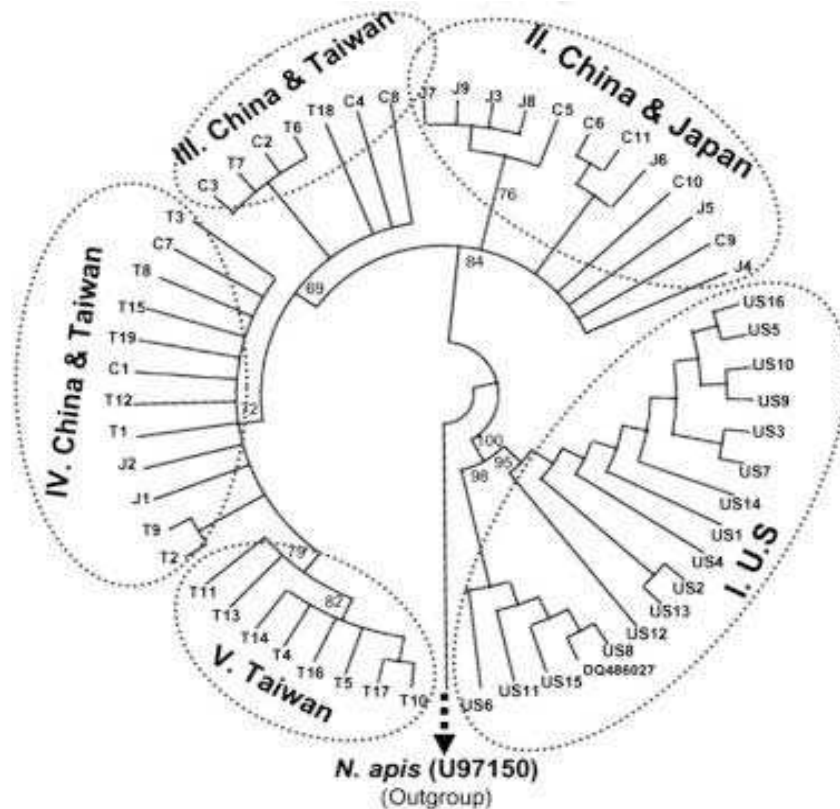


Figure 23: Arbre phylogénétique basé sur la séquence partielle du SSUrDNA de *N. ceranae* isolés de deux espèces d'abeilles, *A. mellifera* et *A. cerana*. Chaque taxon représente un unique individu. US1–16 représentent des *Apis mellifera* collectées aux Etats-Unis. C1–11, J1–9, T1–19 représentent des *Apis cerana* collectées en Chine, au Japon et à Taïwan respectivement. (D'après Chen et al., 2009)

Néanmoins, Chen *et al.* (2009) ont distingué des séquences du SSUrDNA de *N. ceranae* en fonction des espèces hôtes parasitées (*A. cerana* ou *A. mellifera*), et ont suggéré l'existence probable de clades de *N. ceranae* chez l'abeille asiatique *A. cerana* (**Figure 23**). Ces résultats suggèrent que des clades de *N. ceranae* pourraient être observables en élargissant la gamme d'hôtes du parasite. Cependant, dans cette étude, les échantillons issus d'*A. mellifera* ne sont pas décrits, mis à part que les prélèvements ont été réalisés 16 ans auparavant. Ainsi, d'autres facteurs tels que l'ancienneté des échantillons pourraient entrer en compte dans ces observations, nous amenant à rester vigilant dans les interprétations.

L'ensemble de ces résultats montre que les séquences du locus ADNr ne semblent pas appropriées pour les études phylogénétiques chez *N. ceranae*, mais qu'elles pourraient l'être en étudiant plus largement le genre *Nosema* ou en élargissant la gamme d'hôtes étudiés. Sagastume *et al.* (2011) ont été les premiers à discuter des implications évolutives de la diversité de ces séquences (événements de recombinaison, stades sexués...). Celles-ci seront reprises et détaillées plus loin (**Cf IV.C.**) en y incluant les données obtenues dans le cadre du travail présenté ici. Néanmoins, ces hypothèses sont principalement basées sur l'observation du polymorphisme de séquence des ADNr, dont les différentes copies pourraient échapper à une évolution concertée, en occultant les autres gènes présents dans le génome. La diversité nucléotidique de gènes codant les protéines est en effet peu connue chez les microsporidies.

III.B. Les gènes codants des protéines

L'impossibilité de déterminer des taxons intra-spécifiques chez les microsporidies montre les besoins de marqueurs génétiques alternatifs, et si possible de loci non-répétés sur le génome. Plusieurs gènes, notamment les gènes de ménage, ont été utilisés pour la caractérisation moléculaire d'espèces microsporidiennes (Vossbrinck et Vossbrinck-Debreunner, 2005). Les gènes codant l'ARN polymérase II (RPB1), l'alpha- et la beta-tubuline seraient même de meilleurs marqueurs que les ADNr pour l'identification des espèces (Ku *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2008a). RPB1 a par exemple permis de résoudre la phylogénie d'espèces polysporales (Cheney *et al.*, 2001). L'étude du polymorphisme moléculaire intra-spécifique a cependant plutôt porté sur des gènes de virulence, notamment ceux codant des protéines à domaines répétés comme celles retrouvées au niveau de la paroi sporale ou du tube polaire, qui présenteraient un plus fort polymorphisme de séquence.

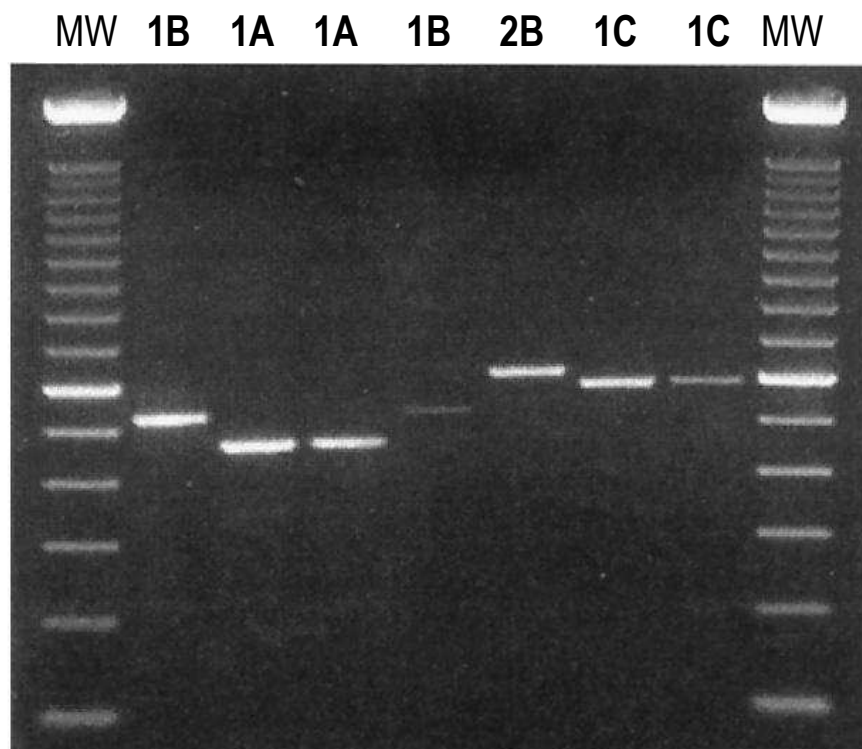


Figure 24 : Génotypage d'isolats d'*E. hellem* par analyse sur gel d'agarose des produits d'amplifications par PCR d'un fragment du gène *ptp1*. Les codes (1A, 1B, 1C et 2B) au-dessus des bandes indiquent le génotype (MW: échelle de poids moléculaire). A chaque génotype correspond une taille de produit d'amplification (461, 521, 581 et 611 bp pour les génotypes 1A, 1B, 1C et 2B respectivement). (D'après Xiao *et al.*, 2001a)

III.B.1. Les protéines de la paroi sporale (EnPs, SWPs)

Une dizaine de protéines pariétales ont été identifiées chez les microsporidies. *E. hellem* possède deux homologues (EhSWP1a et EhSWP1b) de la protéine SWP1 d'*E. cuniculi*. (Polonais *et al.*, 2010). Les séquences de ces deux protéines sont caractérisées par une identité de 84,9%, avec une partie N-terminal identique à 100% et une partie C-terminal très divergente (54.7% d'homologie). Ainsi, cette région C-terminal variable pouvant être un marqueur génétique d'intérêt pour des études de génotypage, Polonais *et al.* (2010) ont analysé la séquence nucléotidique correspondante chez 4 isolats d'*E. hellem*. La séquence de EhSWP1a a montré 32 SNP (polymorphisme d'un seul nucléotide, Single Nucleotide Polymorphism) et des événements d'insertion-délétion (*indels*) (représentant un triplet), prouvant l'existence d'un polymorphisme intra-spécifique de la séquence du gène. Cela suggère que les protéines de la paroi sporale pourraient être utiles aux approches de génotypage. *N. ceranae* possède des homologues à plusieurs EnP et SWP d'*E. cuniculi* et *N. bombycis* mais aucune n'a fait l'objet d'études à ce jour.

III.B.2. Les protéines du tube polaire (PTPs)

A ce jour, 3 protéines du tube polaire (Cf. II.C.3.1.) - PTP1, PTP2 et PTP3 - ont été mises en évidence chez *E. cuniculi* (Delbac *et al.*, 1998; Delbac *et al.*, 2001; Peuvel *et al.*, 2002). Des homologues de PTP1 et PTP2 ont aussi été retrouvés chez plusieurs autres microsporidies (Keohane *et al.*, 1998; Delbac *et al.*, 2001; Polonais *et al.*, 2005) dont *N. bombycis* et *N. ceranae* (Wang *et al.*, 2007; Cornman *et al.*, 2009). Ces protéines présentent un fort polymorphisme entre espèces, rendant souvent la détection d'homologues difficile par simple alignement de séquences, ceux-ci étant parfois détectés par la conservation de la synténie c'est-à-dire de la conservation de l'organisation des gènes *ptp* dans les différents génomes microsporidiens (Delbac *et al.*, 2001). Cette forte variabilité des séquences des PTPs en font des marqueurs intéressants pour le génotypage.

Chez *E. hellem*, la séquence codant PTP1 a été comparée dans 24 isolats différents (Xiao *et al.*, 2001a), mettant en évidence 4 allèles. Les génotypes 1A, 1B et 1C portent respectivement six, sept et huit répétition d'un motif de 60pb. Le génotype 2B contient 8 copies dont cinq sont longues de 66 pb, avec un motif de 6 pb du précédent motif. Ces *indels* induisent une variabilité dans la taille des produits d'amplification du marqueur (**Figure 24**). Des amorces ont ainsi été dessinées pour amplifier spécifiquement la région répétée et ainsi développer une méthode rapide, efficace et peu onéreuse de discrimination des génotypes

(B)

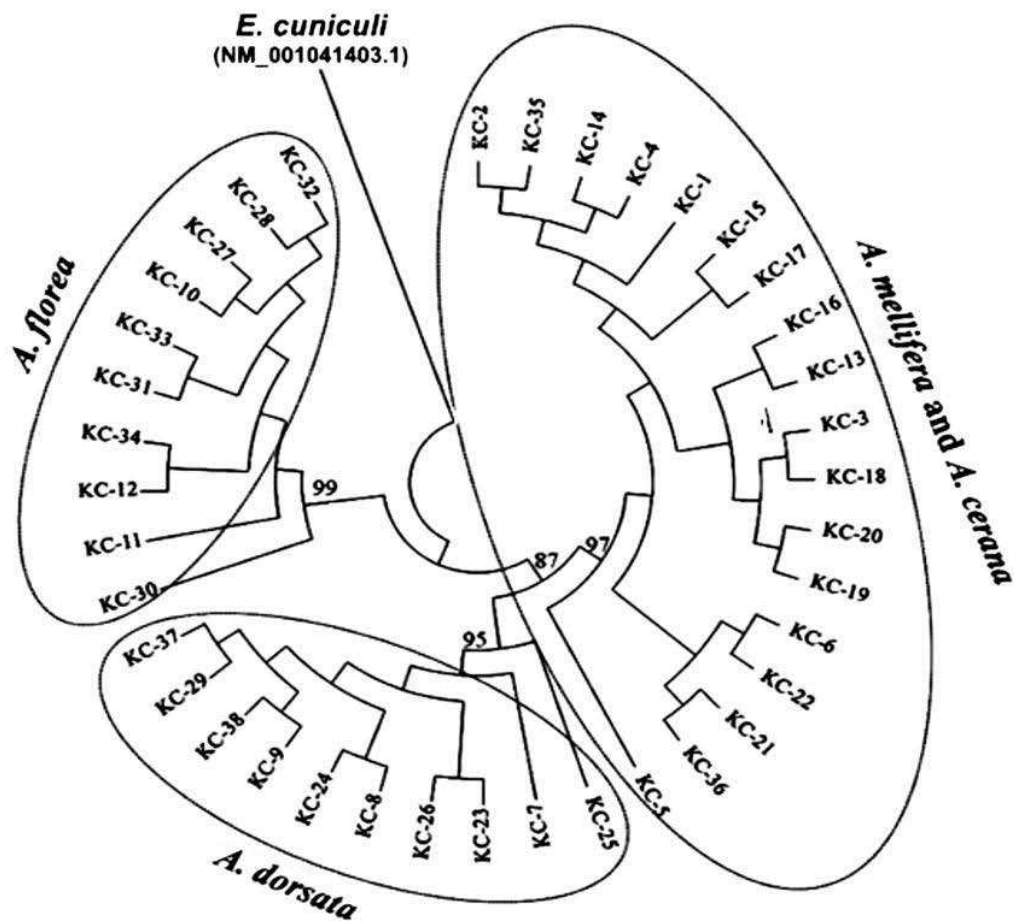


Figure 25 : Arbre phylogénétique des séquences du gène *ptp1* d'isolats de *N. ceranae* provenant de différents hôtes. La séquence de référence est celle du gène *ptp1* d'*E. cuniculi*. L'arbre présente trois clades supportés par de fortes valeurs de bootstrap (D'après Chaimanee *et al.*, 2011)

(Xiao *et al.*, 2001a). La discrimination des isolats semble même meilleure avec cette région de PTP1 qu'avec l'ITS et le SSUrDNA d'*E. hellem*, pour lesquels tous les génotypes n'ont pas été observés.

Chez *N. ceranae*, trois gènes codant des protéines des 3 familles de PTPs (PTP1, PTP2 et PTP3) ont été détectés dans le génome (Cornman *et al.*, 2009). Chaimanee *et al.* (2011) ont recherché les possibles relations génétiques entre isolats de *N. ceranae* provenant de quatre hôtes différents du genre *Apis* en se basant sur le gène codant la protéine PTP1. Aucune différence de séquence n'a été observée entre les isolats provenant d'un même hôte, ainsi qu'entre les isolats d'*A. mellifera* et d'*A. cerana*. Cette absence de diversité nucléotidique entre isolats issus d'un même type d'hôte contraste avec les résultats obtenus chez *E. hellem* avec le marqueur *ptp1*. Cette observation n'a pas été discutée par les auteurs mais elle pourrait être aussi bien due à une réelle identité qu'à un biais technique. Cette étude sur *N. ceranae* est en effet basée sur le séquençage de produits de PCR, ce qui implique l'amplification préférentielle de certaines matrices (Polz et Cavanaugh, 1998). Il est alors possible que ce soit précisément ces mêmes matrices qui ont été séquencées dans les différents isolats, d'où les résultats observés.

En revanche, 22 et 7 SNP ont été observés entre les isolats d'*A. florea* et *A. dorsata* respectivement par rapport aux isolats d'*A. mellifera*/*A. cerana*. En utilisant la séquence de PTP1 de *E. cuniculi* comme groupe externe, un arbre phylogénétique a permis de former 3 clades distincts: un premier correspondant aux isolats d'*A. florea*, un autre aux isolats d'*A. dorsata* et un dernier englobant les isolats d'*A. mellifera* et *A. cerana* (**Figure 25**). Ainsi, comme pour le locus ADNr, la séquence du gène *ptp1* serait un marqueur moléculaire d'intérêt pour distinguer des isolats de *N. ceranae* provenant de différentes espèces hôtes.

La Grèce constituant une combinaison de régions isolées géographiquement et de diversité climatique (avec une zone de climat plutôt continental et une zone méditerranéenne), Hatjina *et al.* (2011) ont émis l'hypothèse que de telles conditions pouvaient faciliter la diversification de *N. ceranae*. Pour tester cette hypothèse, le polymorphisme du gène codant la protéine PTP3 a été étudié. Si les séquences de PTP3 issus d'isolats répartis sur l'ensemble du territoire grec montrent une identité de séquence supérieure à 99.8%, la comparaison des données issues du séquençage de produit de PCR et du séquençage de produits de clonages post-PCR a bien montré le biais de l'approche précédente, qui masque des SNP. Le polymorphisme de PTP3 a cependant été mis en évidence et a même été considéré par Hatjina

et al. (2011) comme suffisamment élevé pour empêcher le génotypage de *N. ceranae*. Cependant, les échantillons étaient composés de plusieurs abeilles d'une même colonie, et non d'un seul individu hôte, rendant difficile toute interprétation. Avant de conclure sur la validité (ou non) d'un tel marqueur, il est nécessaire d'effectuer des études sur un seul individu hôte.

III.C. Discussion sur les études de génotypage chez *N. ceranae*

Il n'est pas évident d'affirmer que les marqueurs provenant de gènes codant pour des protéines soient de meilleurs marqueurs que les gènes du locus ADN_r pour le typage de souches de *N. ceranae* parasitant *A. mellifera*. Néanmoins, certains marqueurs semblent distinguer des clades parasites en fonction de l'espèce d'abeille hôte. Il est cependant étonnant de constater l'absence de diversité nucléotidique dans certaines études alors que d'autres en montrent une relativement importante. Ce phénomène peut être lié à différents biais techniques ou d'échantillonnages qui méritent d'être rediscutés.

L'isolat

L'étude bibliographique des publications précédemment citées met en évidence la grande variabilité des méthodes d'échantillonnage. En effet, un échantillon correspond parfois à un groupe d'abeilles provenant d'une même région géographique, d'un même rucher, d'une même colonie, parfois il représente un individu unique, et certaines études portent simultanément sur plusieurs de ces types d'échantillons. L'utilisation de plusieurs hôtes induit cependant un biais qui amène à réaliser des études multi-populationnelle, à moins de considérer que les abeilles échantillonnées et rassemblées ne soient infectées par une population parasite clonale, ce qui est fortement improbable, et du moins non démontré. Cette problématique se retrouve dans l'usage du terme "souche" dans certaines publications alors que la clonalité des parasites reste fortement hypothétique. La solution à ce problème résiderait dans l'utilisation d'une population clonale issu d'isolement et de culture du parasite, comme cela est réalisé pour des microsporidies telles que *E. cuniculi* (Vavra *et al.*, 1972) ou *Anncaliia algerae* (Monaghan *et al.*, 2011). Cependant, si les essais de culture de *N. ceranae* sur cellules d'insectes sont prometteurs (Gisder *et al.*, 2011), ils ne permettent encore ni l'isolement de souches ni la production de spores. En attendant la possibilité d'isoler des parasites en culture cellulaire, la définition de l'isolat environnemental peut être améliorée, en

considérant le plus petit écosystème parasitaire qu'il est possible de prélever, c'est-à-dire d'étudier la population de *N. ceranae* présente dans un unique individu hôte.

Amplification et séquençage

Malgré l'utilisation d'enzymes de PCR à haute fidélité, des biais d'amplification peuvent se produire (erreurs d'insertion, sur-représentation de matrices, chimères...) et influencer sur l'estimation de la diversité nucléotidique. Aucune des études précédemment citées n'a vérifié ces possibles biais expérimentaux par des contrôles adaptés. Afin de réduire ces biais, Sagastume *et al.* (2011) ont cependant supprimé les singletons (*i.e* les sites polymorphiques observés une seule fois dans leurs données) tout en reconnaissant implicitement que la diversité observée a alors pu être sous-évaluée.

Comme déjà mentionné précédemment, le séquençage direct de produits de PCR apporte également un biais en ne produisant qu'un « consensus » de détection des nucléotides dominants à chaque position. Afin d'évaluer la diversité d'un échantillon, surtout si celui-ci est composé de plusieurs individus hôtes, l'approche de clonage-séquençage paraît la plus adaptée. Elle permet surtout, en séquençant plusieurs clones (issus d'une PCR à nombre limité de cycles, ou mieux encore, de plusieurs réactions de PCR), d'évaluer la diversité nucléotidique au sein de l'échantillon, c'est-à-dire d'étudier la population parasitaire intra-isolat.

Choix des marqueurs génétiques

Les données de la littérature suggèrent que le locus ADNr et les gènes *ptp1* et *ptp3* ne sont pas de bons marqueurs pour faire du génotypage de *N. ceranae* isolés d'*Apis mellifera*. Si la diversité des séquences d'ADNr au sein d'un échantillon pourrait être liée à la multiplicité de copies échappant à une évolution concertée, la problématique semble différente pour les gènes *ptp*. Quoi qu'il en soit, un marqueur seul ne semble pas permettre l'identification de clades parasites infectant *A. mellifera*. Pourtant cette distinction est importante pour comprendre l'histoire évolutive du parasite, sa répartition et ses capacités variables de virulence. Une stratégie qui n'a pas encore été envisagée est l'utilisation de plusieurs marqueurs. Ce type d'approche, dite *multilocus*, a permis chez d'autres pathogènes d'identifier des taxons (Achtman *et al.*, 2012; <http://pubmlst.org/>). Enfin, il ne faut pas non plus négliger les séquences non codantes présentes sur les génomes, notamment les microsatellites, qui sont parfois aussi utilisées pour du typage.

RÉSULTATS

*«On a beau être aventurier, on a beau se sentir explorateur, pionnier des mondes nouveaux,
on finit un jour par être confronté à des problèmes qui nous surpassent.
En tous cas un avion qui défonce mon salon, c'est un problème qui me surpasse.»*

-- Bernard Werber, L'Empire des Anges --

IV- Polymorphisme génétique de *Nosema ceranae* : une approche *multilocus*

Malgré les nombreuses études réalisées pour comprendre l'origine des pertes de colonies d'abeilles dans le monde, aucun facteur unique n'a pu être défini comme en étant la cause principale. L'ensemble des données scientifiques suggère plutôt que ce phénomène aurait une origine multi-causale, qui impliquerait différents facteurs environnementaux, biotiques et abiotiques. Cependant, plusieurs études supposent que le parasite intestinal *Nosema ceranae* jouerait un rôle important dans les pertes observées (Martin-Hernandez, Meana *et al.* 2007 ; Higes, Martin-Hernandez *et al.* 2008). *N. ceranae* est l'agent de la nosérose C (COLOSS, 2009), une des maladies les plus répandues de l'abeille mellifère adulte. Bien que cet organisme ait une répartition mondiale, sa présence n'est pas systématiquement associée à la nosérose, ni à un dépeuplement des colonies ou à des surmortalités (Cox-Foster *et al.*, 2007 ; Invernizzi *et al.*, 2009). Certains auteurs ont émis l'hypothèse que ce phénomène serait dû à une variation de la virulence de *N. ceranae* (Williams, Shafer *et al.* 2008 ; Medici, Sarlo *et al.* 2011). Celle-ci pourrait être liée à l'existence de variants parasitaires, c'est-à-dire la présence de différents génotypes chez *N. ceranae* qui auraient un impact variable sur la santé des abeilles. Afin de tester cette hypothèse, il est nécessaire de pouvoir discriminer de potentiels variants.

Les données actuelles montrent cependant un manque de données moléculaires fiables pour réaliser du génotypage chez *N. ceranae* (**Cf. Chapitre III**). Afin de savoir s'il est possible de différencier des isolats parasitaires par une approche génétique, ce travail a eu pour objectif de discriminer des taxons de *N. ceranae* issus de zones géographiques éloignées en apportant plusieurs améliorations aux approches précédemment utilisées:

- Nous avons utilisé plusieurs marqueurs génétiques (approche *multilocus*) pour augmenter la quantité de données moléculaires, et évaluer leur pouvoir résolutif.
- Afin de réduire au maximum les biais de diversité des populations échantillonnées, et en l'absence de culture clonale de *N. ceranae*, nous avons utilisé le plus petit isolat possible, c'est-à-dire l'individu hôte; ainsi dans ce travail, un isolat correspond à une seule abeille.
- Grâce au séquençage de plusieurs clones par isolat, nous avons comparé la diversité des populations parasitaires entre différents isolats mais aussi au sein même de ces isolats.

| Origine | Echantillonneur | Nombre d'abeilles | Pourcentage d'infection | |
|--------------|-------------------|----------------------|-------------------------|----------------|
| | | | <i>N. ceranae</i> | <i>N. apis</i> |
| Burkina Faso | Malagnoux O. | 6 | 0 | 0 |
| France | Roudel M. | 5 | 100 | 0 |
| Guyane | Corbara B. | 63 | 0 | 0 |
| Laos | Vandamme J. | 36 | 0 | 0 |
| Liban | Vandamme J. | 30 | 50 | 0 |
| Madagascar | Layec Y. | 10 | 0 | 0 |
| Maroc | Tardieux M. | 26 | 15 | 0 |
| Nigéria | Tardieux M. | 20 | 0 | 0 |
| Suède | Fries I. | 15 | 0 | 7 |
| Thaïlande | Chantawannakul P. | 3 | 100 | 0 |

Tableau 2: Origine des abeilles utilisées dans ce travail. La recherche de parasites a été réalisée par PCR. Les abeilles provenant de Thaïlande (Chaimanee *et al.*, 2011) et de France (LMGE) étaient connues pour être infectées par *N. ceranae*. Seules 4 abeilles issues de France, du Liban, du Maroc et de Thaïlande ont été utilisées pour la suite de l'étude.

IV.A. Matériels et Méthodes

IV.A.1. Matériel biologique

Afin d'éviter le plus possible les biais multi-populationnels dans notre étude, nous avons choisi de définir un **isolat** comme étant le **contenu en parasites d'un seul individu hôte**. Nous avons supposé qu'*a priori*, utiliser des abeilles provenant de régions géographiquement distantes nous permettrait de faciliter la détection de distances génétiques entre isolats. Ainsi, des abeilles de la même espèce (*A. mellifera*) ont été prélevées en 2010 et 2011 dans différentes régions du monde : France, Maroc, Nigéria, Liban, Burkina Faso, Guyane, Suède et Thaïlande. Des abeilles de l'espèce *A. cerana* ont également été échantillonnées au Laos (**Tableau 2**).

Les intestins de chaque individu ont été disséqués puis conservés dans 200 µl de PBS (50 mM potassium phosphate, 150 mM NaCl). Ils ont ensuite été broyés à l'aide d'un mini Potter stérile, et centrifugés pendant 3 min à 2 000 xg. Le surnageant a été filtré sur papier wattman grade I, puis de nouveau centrifugé à 8 000 xg pendant 10 min. Les culots ont été re-suspendus dans 200 µL de PBS. La lyse des spores a été effectuée durant 15 min à 100°C. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 10 000 xg pendant 5 min et les surnageants récupérés puis stockés à -20°C. Tous les instruments de dissection et d'extraction utilisés ont été stérilisés entre chaque manipulation afin d'éviter les contaminations entre isolats.

La présence de *N. ceranae* a été vérifiée avec les amorces spécifiques Nc_D1 / Nc_R1 (CGACGATGTGATATGAAAATATTAA / TCATTCTCAAACAAAAACCGTTC), amplifiant une région de la séquence codant le SSUrDNA. De même, l'absence de *N. apis* a été vérifiée avec les amorces Na_D1 / Na_R1 (GCATGTCTTTGACGTACTATGTAC / CGTTTAAAATGTGAAACAACACTATG). Ces amorces correspondent à celles utilisées dans l'étude de Martin-Hernandez *et al.* (2007) et permettent de différencier sur gel d'électrophorèse les produits de PCR en fonction de leur taille (320 pb pour *N. apis*, et 210 pb pour *N. ceranae*). *N. ceranae* a été détectée dans 40% des pays où il y a eu un prélèvement (**Tableau 2**). *N. apis* n'a été trouvée que dans une seule abeille provenant de Suède. Aucune co-infection par les 2 espèces microsporidiennes n'a été observée dans les 214 individus testés. Dans la suite de ce travail seront donc présentés les résultats des expérimentations effectuées sur des abeilles provenant de France (LMGE), du Maroc, du Liban et de Thaïlande. Une seule abeille de chacun de ces pays, infectée uniquement par *N. ceranae*, a été utilisée pour la suite de l'étude.

| Nom de l'ORF | Amorces sens et antisens (de 5' en 3') |
|---|--|
| Gènes inclus dans l'étude de diversité | |
| SSU-rDNA (DQ486027) | MICRO-F2 CACCAGGTTGATTCTGCCTG ^{a,b} Univ-1390 GACGGGCGGTGTGTACAA ^{a,b} |
| EnP1B (NCER_100768) | EnP1B-F GCATTTGTATTTGGGTGG ^{a,b} EnP1B-R ACCAGCAGGTCTGCAATC ^{a,b} |
| PTP2 (NCER_101590) | PTP2-F GTAGCCAAGTTGCCACCT ^{a,b} PTP2-R GGGTTCTGCATCCTTGTC ^{a,b} |
| HSWP4 (NCER_100828) | SWP4-F CATGAACTTAAGGGATTAGCAAG ^{a,b} SWP4-R CTCTTCGTGTGCATCATCCG ^{a,b} |
| SWP25 (NCER_100064) | SWP25-F GGTTTATGTAGCATTGAGGATGC ^{a,b} SWP25-R TGCTGGCATAACAAGTTCCATC ^{a,b} |
| SWP30 (NCER_100566) | SWP30-F ATGCGGGAATATGAACATCC ^{a,b} SWP30-R CTTTAACAACCTGTGTTCTTTCGTAC ^{a,b} |
| NCER_100070 | NCER_100070-F GCCGGCAACAAAACCTATC ^a NCER_100070-R CGTTACTGGCATCACTGTTGG ^a NCER_100070_midF AGGCAGGACTCTTCGATCAC ^b NCER_100070_midR TCATCCTGCGGTTTTATTGG ^b |
| NCER_100533 | NCER_100533-F GAATTGGGATTTGGAGGAGG ^a NCER_100533-R TCTGAAGGGTCGGGTGAAG ^a NCER_100533_endF CCGAGGGTCAACAAAATGAC ^b NCER_100533_endR ACATTCCCTGTGGCAAATC ^b |
| NCER_101600 | NCER_101600-F GCCTATGACTTCATTACAAGAAGAATC ^{a,b} NCER_101600-R TCACTCGTAAGTTTCGCATTG ^{a,b} |
| NCER_101165 | NCER_101165-F AATCCGCTAACTCGACCTTC ^a NCER_101165-R GAGATTTCGGGTCGACAATG ^a NCER_101165_endF TCGACCCGAAATCTCAACTC ^b NCER_101165_endR GTGTGCCTTCATCATCATCG ^b |
| Autres gènes | |
| αPDH (NCER_100821) | aPDH-F ATGATACATTATTATTTGGTAG ^a aPDH-R TTCAGAATAAACATCTTTTAAAA ^a |
| EnP1A (NCER_101082) | NCER_101082-F gccatagACCGCTGTTATTGCTGAAGG ^a NCER_101082-R ttcgatccCATCGATAATAAGGCGAAGAAC ^a |
| Hexokinase (NCER_101108) | Nc1108F caccatagTATGATGTACCAGGTTACAC ^a Nc1108R taggatccAGCTTGCTTTTCACAATCATCG ^a |
| PTP1 (NCER_101591) | NCER_101591-F ggtcatatgGCAGGACAACAAGGAAGACCTG ^a NCER_101591-R caggatccGGTGGATTGTTTCCTTGAG ^a |
| PTP4 (NCER_100526) | NcPTP4Bam cgggatccTCAACTTCGGGAAACTGG ^a NcPTP4Eco cggaattcCATCAGAAAAGTTCCAGC ^a |
| SWP26 (NCER_100295) | NcSWP26Bam cgggatccGACCTTGACCCATTCTGG ^a NcSWP26Eco cggaattcCTTCTTTTCAACGGTTGC ^a |

Tableau 3: Gènes marqueurs choisis et amorces utilisées lors des amplifications PCR^(a) et des RT-PCR^(b). Les amorces utilisées pour amplifier le SSUrDNA correspondent à celles publiées par Visvesvara *et al.* (1994) et Zheng *et al.* (1996). Toutes les autres amorces ont été dessinées pour ce travail. Les lettres en minuscule désignent des nucléotides correspondant à des sites de restrictions, ne s'hybridant pas sur le gène marqueur mais qui ont été ajoutés en vue d'un éventuel clonage en vecteur d'expression. Un nombre insuffisant de clones portant les inserts EnP1A et PTP1 ayant été obtenu, ces marqueurs n'ont pas été étudiés par la suite. Les gènes codant les protéines αPDH, SWP26, Hexokinase et PTP4 ont été étudiés dans un travail préliminaire qui ne comprenait que deux isolats.

IV.A.2. Analyses de séquences protéiques

Pour sélectionner des marqueurs de diversité, l'algorithme SignalP version 3.0 (Bendsten *et al.*, 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) a été utilisé pour rechercher des peptides signaux sur les séquences protéiques des gènes prédits chez *N. ceranae*. Des travaux (Zhang and Henzel, 2004) ont expertisé la robustesse des algorithmes de prédiction de peptides signaux en comparant les résultats de prédiction aux données expérimentales pour 270 protéines humaines caractérisées comme protéines secrétées. L'algorithme le plus efficace de cette étude était SignalP avec un taux de reconnaissance de 78% des sites signaux. La détection des motifs répétés sur les séquences protéiques a été effectuée à l'aide du logiciel MEME (Bailey *et al.*, 2009; <http://meme.nbcr.net/meme/>). Les séquences des motifs répétés des protéines EnP1B et NCER_101600 obtenues dans l'ensemble des données collectées (respectivement 264 et 678 motifs) ont été alignées afin de modéliser un logo de ces motifs grâce à l'application WebLogo (Crooks *et al.*, 2004).

IV.A.3. Extraction d'ARN et RT-PCR

Afin de vérifier que les marqueurs sélectionnés sont réellement des gènes exprimés, l'ARN total de l'intestin moyen d'une abeille naturellement infectée (rucher LMGE) a été extrait avec le kit « SV total RNA Isolation System Kit » (Promega). L'ADN complémentaire a été synthétisé à partir de 100 ng d'ARN total en utilisant le kit « ImProm-II Reverse Transcription System » (Promega) et une amorce oligo-d(T) (Invitrogen). Les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant la « GoTaq® DNA Polymerase » (Promega) et à l'aide des amorces présentées dans le **Tableau 3**. Des contrôles ont été réalisés, avec des réactions sans transcriptase inverse (contrôles négatifs), et en utilisant de l'ADN génomique de *N. ceranae* comme matrice de PCR (contrôles positifs).

IV.A.4. Amplification et clonage des marqueurs

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 20 µL contenant 1 µL d'échantillon, de 1 à 4 mM de MgSO₄ selon le marqueur, 200 µM de chaque dNTP, 0.4 nM de chaque amorce, 1 Unité de Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Les réactions d'amplification ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur UnoCycler (VWR). Après une étape de dénaturation (30 s à 94°C), 35 cycles ont été répétés avec une dénaturation de 30 s à 94°C, une hybridation de 30 s à 52°C, une élongation de 45 s (1 min pour le marqueur SSU) à 68°C. Une ultime étape de 15 min à 72°C a été réalisée après ajout

d'une unité de « GoTaq® DNA Polymerase » (Promega) pour optimiser le transfert d'un résidu désoxyadenosine (A) aux extrémités 3' des amplicons.

Les tailles des produits PCR ont été vérifiées par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% dans du tampon de migration TBE (44.5 mM Tris base, 44.45 mM acide borique, 1 mM EDTA, pH 8.0), et visualisation au bromure d'éthidium. Les fragments ont ensuite été insérés dans le vecteur pCR®II-TOPO en suivant les instructions du fournisseur (TOPO® TA Cloning kit, Invitrogen). 100 µl de bactéries *Escherichia coli* DH5α thermocompétentes ont été transformées par choc thermique en présence du mélange réactionnel. Les bactéries ayant intégré un plasmide avec un insert ont été sélectionnées sur milieu LB additionné d'ampicilline (100 µg.mL⁻¹) et criblées grâce à l'ajout de X-Gal (50 µg.mL⁻¹). Les colonies blanches obtenues ont été mises en culture dans du milieu LB-ampicilline et ont été incubées à 37°C pendant une nuit. Les extractions des plasmides ont été réalisées en utilisant le kit « QIAprep Spin Miniprep Kit » (QIAGEN).

Un témoin a été réalisé afin d'observer les éventuelles modifications de séquences apportées lors de l'ensemble du processus expérimental. Une préparation clonale d'un plasmide portant un insert de SWP30 a été utilisée comme matrice pour l'amplification.

IV.A.5. Séquençage et édition des séquences

Les préparations d'ADN plasmidique ont été séquencées (Gatc Biotech, Allemagne) de manière bi-directionnelle en utilisant les amorces universelles M13-RP et T7 qui encadrent le site d'insertion dans le vecteur. L'analyse et l'alignement des séquences ont été réalisés grâce à l'algorithme Clustal W du programme BIOEDIT 7.1.3.0 (Hall, 1999). Les inserts ayant été séquencés dans les deux sens, lorsque les résultats étaient contradictoires (différence de nucléotides sur les deux séquences), une vérification manuelle sur les électrophorégrammes a permis de lever les doutes et de corriger les erreurs de lecture. Après élimination des séquences correspondant aux amorces de PCR, toutes les séquences obtenues pour chaque marqueur ont été alignées. Lorsque plusieurs alignements étaient possibles du fait de la présence d'insertions-délétions (*indels*), l'alignement le plus parcimonieux a été manuellement ajusté.

IV.A.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques concernant la diversité, les ratios de transition/transversion et les hypothèses de sélection ont été réalisés sous MEGA5, en utilisant le paramètre « pairwise

deletion », qui permet de considérer les *indels* comme du polymorphisme et non comme des sites ambigus à ne pas prendre en compte (Nei and Kumar, 2000 ; Tamura *et al.*, 2011).

La **diversité nucléotidique** d'un marqueur a été calculée en faisant la moyenne des *p*-distances (*i.e* le nombre moyen de différences par site) des séquences prises deux à deux, pour toutes les séquences (π) et pour les séquences au sein (π_w) et entre (π_b) isolats.

Afin d'évaluer la divergence des populations isolées, la diversité expliquée par leur structure génétique, et la part de la diversité inter-populationnelle par rapport à la diversité génétique globale ont été représentées par l'**indice de fixation** (F_{ST}) et le **coefficient de différenciation évolutive** (G_{ST}), respectivement. Plus le F_{ST} est petit par rapport à la diversité globale, moins la composition allélique des sous-populations explique la diversité observée. Le G_{ST} varie de 0 à 1, plus il est petit, moins la part de la diversité entre populations sera importante dans la diversité globale. Les estimations des écart-types ont été obtenues avec une itération de 10 000 répliques.

Les **biais de transition et transversion** ($R_{S/V}$) ont été calculés à partir du modèle de substitution nucléotidique estimé à l'aide de l'algorithme du maximum de vraisemblance composée.

Les **tests sur la sélection**, basés sur les substitutions de codons, ont été réalisés en calculant la probabilité de rejeter l'hypothèse d'une stricte neutralité ($d_N=d_S$) des taux de substitution non synonymes (modification d'un acide aminé) et synonymes (mutation silencieuse) lorsqu'il n'y a pas de sélection, en faveur d'une hypothèse alternative, soit $d_N>d_S$ pour la sélection positive (évolution adaptative), soit $d_N<d_S$ pour la sélection purifiante (contraintes sélectives ; Yang and Bielawski, 2000). Ils ont été basés sur la méthode Li-Wu-Luo, et les valeurs de significativité (les tests dont la *p*-value est <0.05 étant considérés comme significatifs) ont été calculées grâce une itération du test avec 10 000 répliques.

Des tests complémentaires relatifs aux populations ont été réalisés avec le logiciel DnaSP (Librado and Rozas, 2009 ; Rozas, 2009), en éliminant cette fois-ci toutes les positions contenant des gaps (« complete deletion »). Les tests statistiques de significativité ont été calculés grâce à une itération avec 10 000 répliques (les tests dont la *p*-value est <0.05 sont considérés comme significatifs).

Le **test de Tajima** (D) permet de distinguer des séquences d'ADN évoluant au hasard (hypothèse nulle), ou sous pression de sélection, en se basant sur la valeur de π . Un D négatif représente un excès de polymorphisme de faible fréquence, relatif à une population en expansion et/ou une sélection purifiante. Un D positif représente des polymorphismes de

haute et basse fréquences en nombre restreint, indiquant une diminution de la population et/ou une sélection positive (Tajima, 1989)

Le test de Ramos-Onsins et Rozas (R_2) permet d'étudier l'expansion d'une population en se basant sur les fréquences des mutations de sites nucléiques. De faibles valeurs de R_2 définissent une population ayant subi ou subissant une expansion (Ramos-Onsins and Rozas, 2002).

Le test de Fu (F_s) : permet aussi d'étudier l'expansion d'une population, mais en se basant sur la distribution des allèles dans la population. F_s aura tendance à être positif si une fréquence d'un allèle est forte comparée aux autres (sélection positive), et négatif s'il y a un excès d'allèles rares dans une population (expansion) (Fu, 1997).

Le déséquilibre de liaison (ou Linkage Disequilibrium, **LD**), *i.e* l'association non-aléatoire d'allèles sur deux ou plusieurs loci, a été estimé en utilisant le **test de Rozas (ZZ)**. Ce test représente la différence entre la corrélation moyenne entre sites polymorphiques adjacents (Z_A) moins la corrélation moyenne entre tous les sites d'un ensemble de séquences (Z_{ns}). Plus les valeurs sont fortement positives, plus la probabilité d'avoir des événements de recombinaison est forte entre deux sites (Rozas *et al.*, 2001).

La **diversité des allèles** (*i.e*, l'hétérozygotie attendue, aussi appelée la probabilité de non identité des allèles **Hd**), le nombre total de paires de sites polymorphiques et le nombre de paires de sites polymorphiques dont les LD sont significatifs ont été calculés, afin de pouvoir obtenir le nombre de recombinaisons minimum (**R_m**) pouvant expliquer la diversité.

IV.A.7. Modélisations

Les arbres phylogénétiques ont été construits sous MEGA5, en utilisant l'algorithme du maximum de vraisemblance avec 10 000 itérations, le modèle de substitution nucléotidique basé sur la méthode de Tamura à 3 paramètres et la plus simple méthode heuristique de construction d'arbre, basée sur le « Nearest-Neighbour-Interchange ».

Les réseaux d'haplotypes ont été réalisés à l'aide des logiciels Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005) et HapStar (Teacher and Griffiths, 2011).

La modélisation de la structure secondaire de l'ARN de la petite sous-unité du ribosome a été basée sur le modèle microsporidien disponible sur le Comparative RNA Web site (CRW, www.rna.icmb.utexas.edu) et sur d'autres structures publiées (Hartskeerl *et al.*, 1993; Dong *et al.*, 2011). Lorsque plusieurs modèles n'étaient localement pas concordants, une structure alternative a été proposée. Les sites polymorphiques issus des 39 séquences

obtenues dans ce travail et de 88 autres séquences disponibles dans les bases de données (Numéros d'accèsion DQ673615, FJ481912, DQ078785, DQ329034, U26533, DQ374655-6, DQ486027-8, GU131043-GU131121), dont les données issues de l'étude de Sagastume *et al.* (2011), ont été localisés sur la structure secondaire. Pour éviter d'inclure des biais (en l'absence de contrôle connu pour ces 88 séquences), les singletons ont été éliminés de ce dernier groupe de données, comme l'ont fait Sagastume *et al.* (2011). Les singletons observés dans ce travail ont en revanche été conservés.



Figure 26: Recherche de domaines répétés à l'aide du logiciel MEME dans les séquences codées par NCER_100533 (a), NCER_101600 (b) et NCER_100070 (c). Au-dessous du motif répété, les cadres bleus indiquent la localisation des répétitions de ce motif sur la séquence protéique.

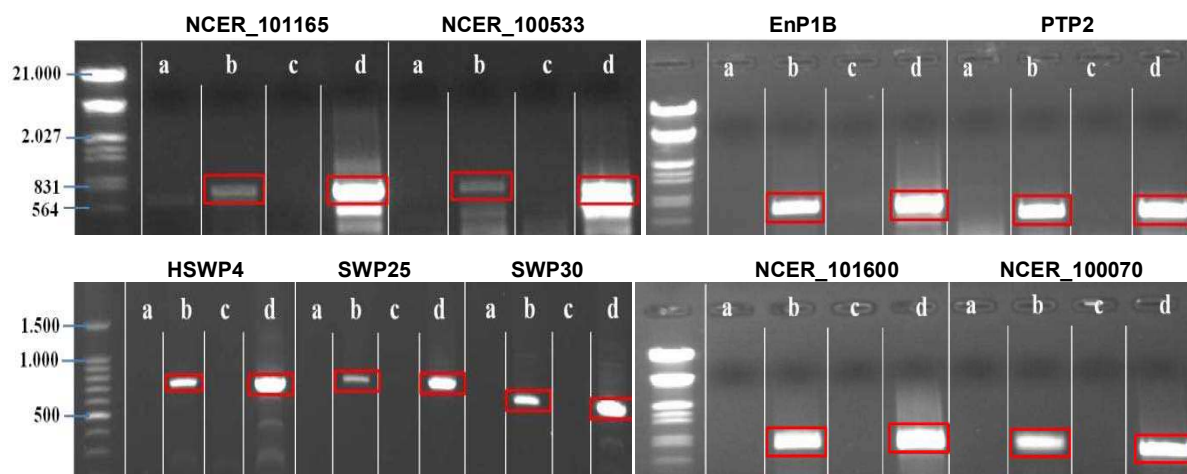


Figure 27: Détection de transcrits par RT-PCR. Pour chaque marqueur, un témoin d'amplification par PCR sans matrice (a), une amplification par PCR des ADN génomique (b), un témoin de réaction de RT-PCR faite sans enzyme (c) et une amplification par PCR sur ADNc obtenu par RT-PCR (d) ont été réalisés. Les cadres rouges indiquent les bandes correspondant aux tailles attendues pour les produits d'amplifications. Excepté pour les (H)SWPs, le marqueur de tailles moléculaires utilisé est identique. Gel d'électrophorèse à 1% d'agarose.

IV.B. Résultats

IV.B.1. Sélection des marqueurs

Au total, 12 marqueurs génétiques ont été recherchés et sélectionnés dans le génome de *N. ceranae* (**Tableau 3**), notamment des homologues aux marqueurs ayant permis de différencier des isolats chez d'autres espèces microsporidiennes. Afin d'avoir un point de comparaison entre nos résultats et ceux d'études précédentes, la séquence codant le SSUrDNA a été choisie, mais dans sa quasi-totalité (1145 pb sur 1234 pb).

Plusieurs gènes codant des protéines de la paroi sporale et du tube polaire ont été identifiés dans le génome de *N. ceranae*. Quatre de ces gènes ont été nommés selon leurs homologues connus chez *N. bombycis* (**Tableau 3**). Ils codent pour les protéines PTP2, SWP25, SWP30 et HSWP4 (Wu *et al.*, 2008, 2009). Le gène NCER_100768 code pour une protéine homologue à la protéine de la paroi sporale EnP1 d'*E. cuniculi* (Southern *et al.*, 2007), excepté pour ses 32 premiers codons. Nous proposons de déplacer le codon de départ du GTG proposé dans le génome vers le premier codon ATG en amont, et de renommer ce nouveau cadre de lecture EnP1B, puisque un autre gène (NCER_101082) avec une plus forte homologie de séquence avec EnP1 d'*E. cuniculi* existe déjà dans le génome. Ce dernier gène codant EnP1 (NCER_101082) ainsi que celui codant la protéine du tube polaire PTP1 (NCER_101591), homologue au gène *ptp1* chez *E. cuniculi*, n'ont pas été amplifiés dans tous les isolats et/ou clonés en assez grand nombre pour être intégrés dans ce travail.

Pour compléter, le génome de *N. ceranae* a été criblé pour rechercher des gènes codant des protéines portant un signal de sécrétion (donc potentiellement sécrétées, comme c'est le cas des protéines pariétales) et parfois aussi un domaine répété (des modifications dans le nombre de répétitions pouvant faciliter l'identification rapide de souches parasitaires, Cf **Chapitre III**). Quatre gènes codant des protéines portant une séquence signal N-terminale ont été choisis. Parmi ces quatre, deux cadres de lecture, NCER_101165 et NCER_100070, ont été sélectionnés en raison de leur forte probabilité de comporter un signal de sécrétion (0.95 et de 0.97 respectivement). Trois cadres de lecture, NCER_100533, NCER_101600 et NCER_100070 codent des protéines portant à la fois un peptide signal potentiel (probabilité supérieure à 0.80) et un motif peptidique interne répété cinq fois pour les deux premiers et 12 fois pour le dernier (**Figure 26**).

Afin de vérifier si les neuf cadres de lecture sélectionnés (**Tableau 3**) correspondent à des gènes réellement exprimés, une RT-PCR a été réalisée pour détecter la présence d'ARNm de chacun d'entre eux (**Figure 27**). Il a ainsi été montré que ces gènes de *N. ceranae* sont

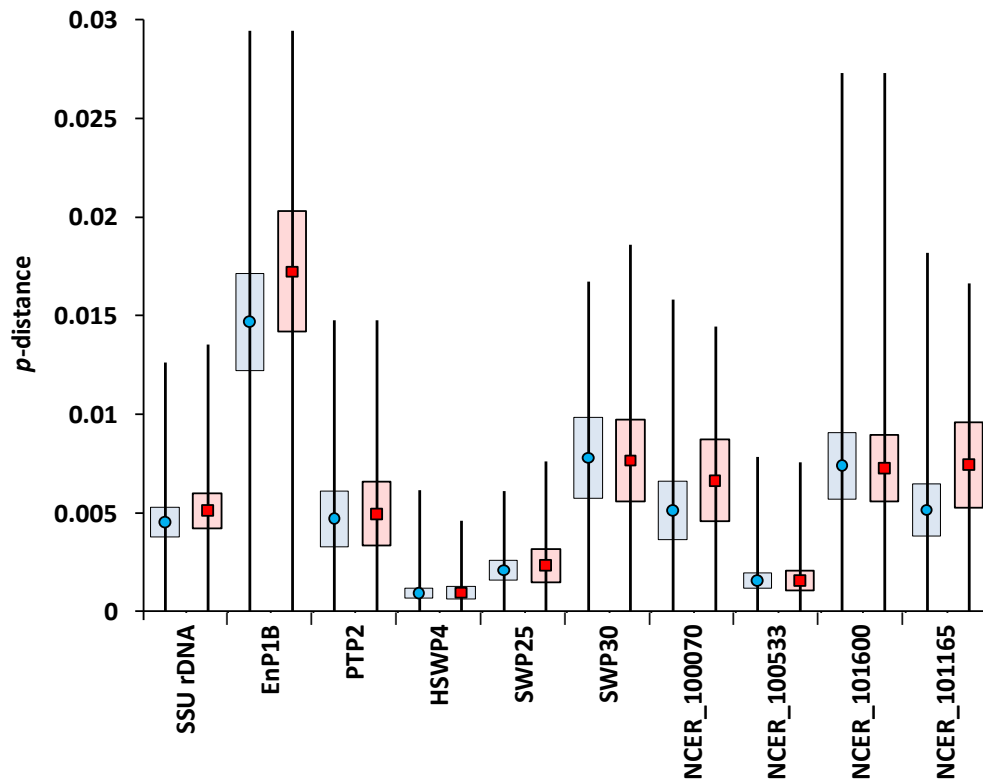


Figure 28: Diversité nucléotidique de 10 séquences codantes de *N. ceranae*. La diversité est représentée par la moyenne des p -distances (probabilité de différences par site) entre deux séquences issues d'un même isolat (π_w , cercles bleus) ou d'isolats distants (π_b , carrés rouges). Les boîtes représentent les écart-types obtenus par 10 000 itérations de calculs. Les lignes verticales représentent l'intervalle des p -distances, indiquant les valeurs minimales et maximales obtenues.

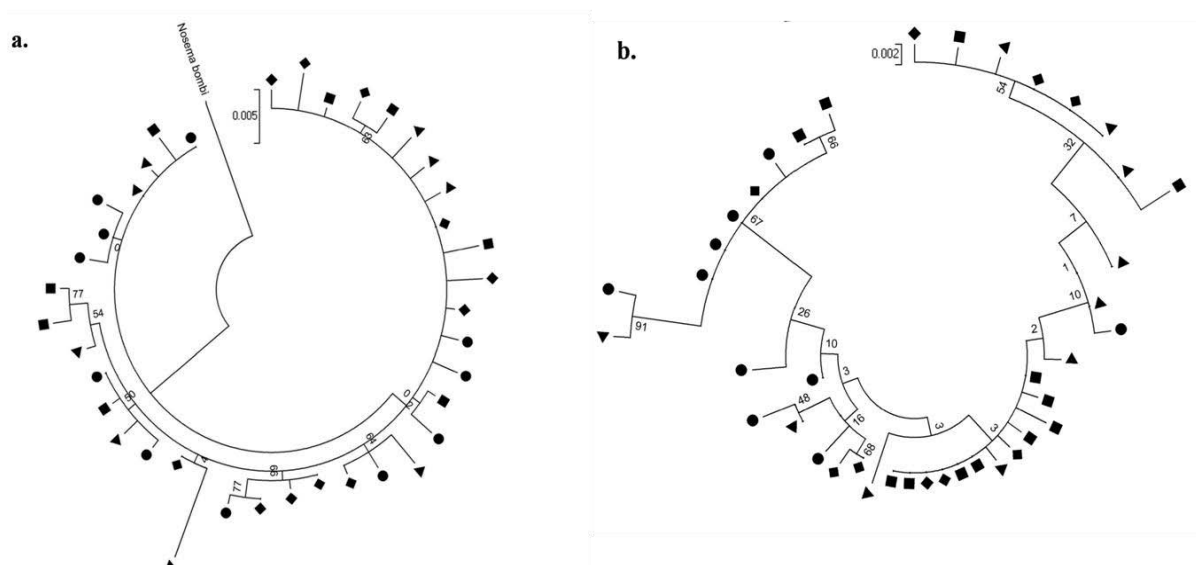


Figure 29: Arbres phylogénétiques des séquences des gènes codant le SSUrDNA (a) et EnP1B (b). La séquence du gène codant le SSUrDNA de *N. bombi* a été utilisée comme groupe externe pour le premier arbre tandis que le second arbre n'en comporte pas, EnP1B n'ayant pas d'homologue proche dans les bases de données. Les séquences provenant de France, du Liban, du Maroc et de la Thaïlande sont respectivement représentées par des carrés, des ronds, des triangles et des losanges.

Tableau 4. Caractéristiques et statistiques des distances génétiques des séquences des 10 marqueurs génétiques de *N. ceranae*.

| Marqueur | SSU-rDNA | EnP1B | PTP2 | HSWP4 | SWP25 | SWP30 | NCER_ 100070 | NCER_ 100533 | NCER_ 101600 | NCER_ 101165 |
|---|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Taille analysée des séquences | 1116 pb | 732 pb | 474 pb | 650 pb | 655 pb | 537 pb | 698 pb | 671 pb | 902 pb | 660 pb |
| Nombre de séquences | 39 | 41 | 44 | 42 | 39 | 42 | 40 | 37 | 59 | 44 |
| Nombre d'allèles | 37 | 33 | 22 | 13 | 20 | 25 | 22 | 14 | 27 | 25 |
| Nombre de sites variables | 66 | 56 | 26 | 14 | 23 | 35 | 23 | 18 | 48 | 31 |
| Nombre de singletons | 55 | 24 | 22 | 14 | 22 | 28 | 16 | 17 | 31 | 24 |
| Taille (et nombre) d' <i>indels</i> | 1(x6)1,2,4 | 21(x2),24, 45,87 | - | - | - | - | 1(x4),3 | 1,36,144 | 1,60,85,108,114, 150,216,228,444 | - |
| Diversité nucléotidiques globale, π | 0.00446 ± 0.00081 | 0.01782 ± 0.00283 | 0.00503 ± 0.00154 | 0.00102 ± 0.00026 | 0.00231 ± 0.00067 | 0.00766 ± 0.00199 | 0.00635 ± 0.00194 | 0.00155 ± 0.00036 | 0.00716 ± 0.00161 | 0.00695 ± 0.00193 |
| p-distance intra isolat, π_w | 0.00454 ± 0.00083 | 0.01468 ± 0.00245 | 0.00470 ± 0.00140 | 0.00094 ± 0.00024 | 0.00209 ± 0.00051 | 0.00779 ± 0.00206 | 0.00513 ± 0.00149 | 0.00157 ± 0.00037 | 0.00737 ± 0.00162 | 0.00515 ± 0.00133 |
| p-distance inter isolat π_b | 0.00453 ± 0.00092 | 0.01723 ± 0.00306 | 0.00495 ± 0.00162 | 0.00095 ± 0.00033 | 0.00233 ± 0.00083 | 0.00765 ± 0.00206 | 0.00664 ± 0.00207 | 0.00157 ± 0.00052 | 0.00725 ± 0.00161 | 0.00744 ± 0.00217 |
| Indice de fixation, F_{ST} | -0.00008 ± 0.00008 | 0.00204 ± 0.00044 | 0.00031 ± 0.00022 | 0.00008 ± 0.00004 | 0.00023 ± 0.00022 | - 0.00010 ± 0.00015 | 0.00118 ± 0.00004 | - 0.00001 ± 0.00006 | - 0.00021 ± 0.00010 | 0.00180 ± 0.00067 |
| Coefficient de différentiation évolutive, G_{ST} | - 0.02 ± 0.02 | 0.12 ± 0.02 | 0.06 ± 0.03 | 0.08 ± 0.03 | 0.10 ± 0.07 | - 0.01 ± 0.02 | 0.19 ± 0.03 | - 0.01 ± 0.04 | - 0.03 ± 0.01 | 0.26 ± 0.04 |

effectivement exprimés dans une abeille infectée et qu'ils pouvaient donc être soumis à des processus évolutifs.

IV.B.2. Polymorphisme intra- et inter-isolats des marqueurs

Après amplification et clonage, les plasmides de plusieurs clones ont été extraits et leurs inserts ont été séquencés. De 8 à 15 séquences ont été obtenues pour chaque marqueur dans chaque isolat et chaque marqueur, pour un total de 426 séquences, disponibles en ligne sur GenBank (numéros d'accessions KC680230 à KC680656). Le contrôle expérimental, réalisé à partir d'une préparation plasmidique clonale de SWP30, n'a montré aucun polymorphisme nucléotidique dans les 15 séquences obtenues, montrant qu'aucun biais n'a été introduit lors du processus expérimental. Le polymorphisme observé représente donc bien la diversité présente dans les échantillons.

Quelque soit le marqueur utilisé, un fort contenu allélique, principalement du à des singletons, a été observé, et ceci, même dans les populations provenant d'un seul hôte (**Tableau 4**). Les π_w et les π_b sont très similaires, montrant qu'il y a, en moyenne, autant de variabilité au sein des populations parasitaires infectant une seule abeille qu'entre populations infectant des abeilles de régions distantes (**Figure 28; Tableau 4**). De plus, les maxima des p -distances intra- et inter-isolats sont très proches (**Figure 28**), suggérant que les séquences les plus polymorphiques peuvent se trouver à l'intérieur d'un même individu parasité. Pour tous les marqueurs, les minima des p -distances sont nuls, indiquant qu'il y a toujours au moins 2 allèles identiques dans un isolat, mais aussi que le même allèle existe dans au moins deux isolats différents (**Figure 28**). Ces données suggèrent que les populations parasitaires infectant *A. mellifera* sont similaires dans les quatre régions échantillonnées. Cette hypothèse est soutenue par les faibles valeurs de F_{ST} et de G_{ST} , c'est-à-dire que la composition génétique des sous-populations n'explique pas une telle diversité (F_{ST}) et que la part de la diversité inter-populationnelle dans la diversité globale est faible (de 0 à 26%) (**Tableau 4**). Ainsi, la diversité nucléotidique est déjà majoritairement présente au sein des isolats.

La diversité nucléotidique est variable selon les marqueurs, avec un π moyen allant de 0.001 à 0.018 pour HSWP4 et EnP1B respectivement (**Figure 28, Tableau 4**). Néanmoins, ces valeurs sont trop faibles, surtout comparées à leurs π_w respectifs, pour permettre de différencier des populations entre isolats. En effet, les analyses phylogénétiques ne parviennent pas à différencier des taxons (**Figure 29**): peu importe le marqueur et le modèle choisi pour effectuer ces analyses, les arbres construits ont des topologies supportées par de

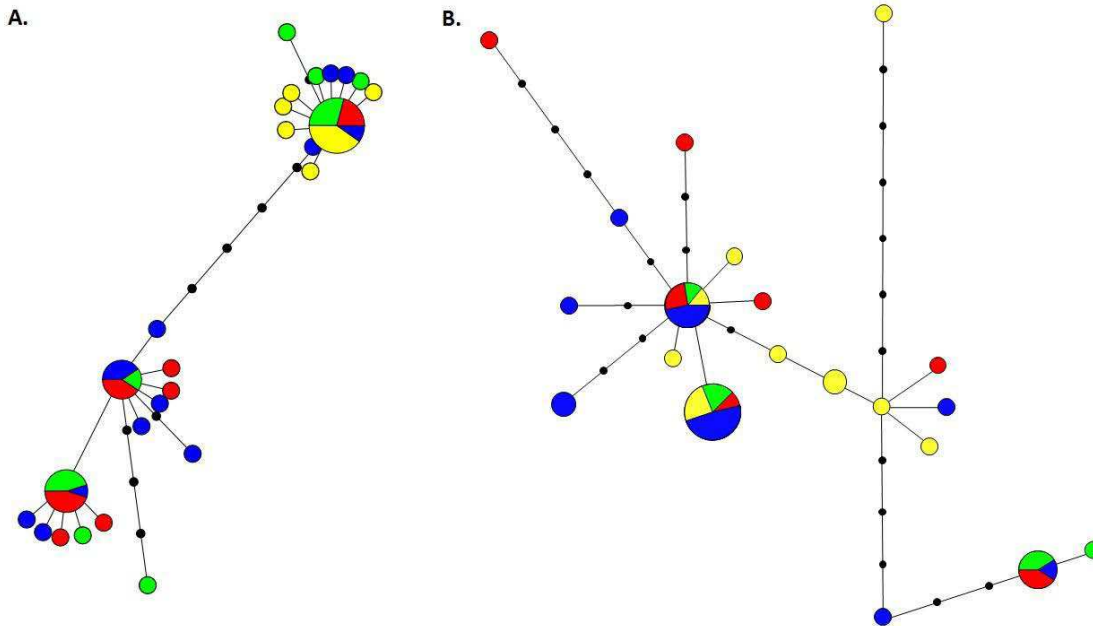


Figure 30: Réseau des haplotypes des gènes NCER_101165 (A) et NCER_101600 (B). Les haplotypes sont représentés par des cercles dont la taille représente le nombre d'haplotypes identiques. Les cercles sont colorés en fonction de leur origine: France (bleu), Liban (vert), Maroc (jaune) et Thaïlande (rouge). Les cercles noirs représentent les distances (nombre de sites polymorphiques) entre deux haplotypes.

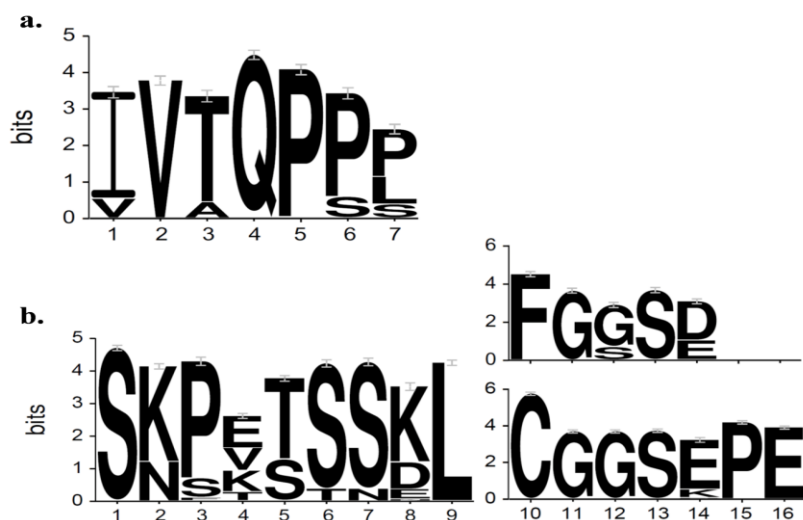


Figure 31: Logo des motifs répétés de EnP1B (a) et NCER_101600 (b), réalisés grâce à l'alignement respectifs de 264 et 678 séquences peptidiques obtenues pour tous les isolats. La hauteur de chaque lettre est proportionnelle à la fréquence de l'acide aminé correspondant et la taille globale d'un empilement de lettre est proportionnelle à la conservation de la séquence à la position correspondante (100% de conservation correspond ici à un score de 4.32 bits).

| Consensus | NDHKKPMILTRNGTLSPYIEGRNTSKYAFICIGVCPSKPRLLKSPLCDFKCMPTREVTSPSSTGLSPSYQINNQQKNGTELLPCVPNNQPPP | I | | II | | III | | IV | |
|------------|--|---------|----------|---------|---------|---------|--|----|--|
| T1_3 | | IVTQFSS | CPCQQLLS | VVTQFPL | IVTQFPP | IVAQFPP | | | |
| T4 | | | | | | | | | |
| T5 | | | | | | | | | |
| F1 | | | | | | | | | |
| L1 | P | | | | | | | | |
| F2 | | | | | | | | | |
| F3 | | | | | | | | | |
| T6 | | | | | | | | | |
| L2 | | | | | | | | | |
| F4 | | | | | | | | | |
| T7 | | | | | | | | | |
| T8 | | | | | | | | | |
| M1 | | | | | | | | | |
| F5 | | | | | | | | | |
| F6 | | | | | | | | | |
| L3 | | | | | | | | | |
| F7 | | | | | | | | | |
| F8 | | | | | | | | | |
| F9 | | | | | | | | | |
| L4 | | | | | | | | | |
| L5M3-5M8-9 | | | | | | | | | |
| L6 | | | | | | | | | |
| M2 | | | | | | | | | |
| M6 | | | | | | | | | |
| M7 | I | | | | | | | | |
| T9 | | | | | | | | | |
| F10 | | | | | | | | | |
| L7 | | | | | | | | | |
| L8 | | | | | | | | | |
| L9 | | | | | | | | | |
| M10 | | | | | | | | | |
| T10 | | | | | | | | | |
| T11 | | | | | | | | | |
| M11 | | | | | | | | | |

| Consensus | V | VI | VII | VIII | CPCPQPPP | CYCEDSDLEDNDRITCGPIKDVRKQLEICRDCNGEENGIRREKEVVRTKTFFVIFIDDGIFGLIEKETFSLDVVKTKYCLNILD |
|------------|---------|---------|---------|---------|----------|--|
| T1_3 | IVTQFPL | IVTQFPP | IVTQFPP | IVTQFPP | | |
| T4 | | | | | | |
| T5 | | | | | | |
| F1 | | | | | | |
| L1 | | | | | | |
| F2 | | | | | | |
| F3 | | | | | | |
| T6 | | | | | | |
| L2 | | | | | | |
| F4 | | | | | | |
| T7 | | | | | | |
| T8 | | | | | | |
| M1 | | | | | | |
| F5 | | | | | | |
| F6 | | | | | | |
| L3 | | | | | | |
| F7 | | | | | | |
| F8 | | | | | | |
| F9 | | | | | | |
| L4 | | | | | | |
| L5M3-5M8-9 | | | | | | |
| L6 | A | | | | | |
| M2 | | | | | | |
| M6 | | | | | | |
| M7 | | | | | | |
| T9 | | | A | | | |
| F10 | | | A | | | |
| L7 | | | | | | |
| L8 | | | | | | |
| L9 | | | | | | |
| M10 | | | A | | | |
| T10 | | | A | | | |
| T11 | | | | | | |
| M11 | | | A | | | |

Figure 32: Alignement partiel et centré sur les motifs répétés des séquences protéiques de EnP1B des différents isolats. Le consensus des séquences est indiqué en première ligne. En dessous, les lignes symbolisent une identité, les lettres une substitution d'acide aminé, les points des substitutions nucléotidiques synonymes et des vides représentent des délétions. L'étoile indique une substitution non-sens. Les motifs répétés sont séparés par des lignes verticales et sont numérotés par des chiffres latins en haut.

Tableau 5 : Statistiques des tests sur la sélection et l'évolution des populations des séquences des 10 marqueurs génétiques de *N. ceranae*.

| Marker | SSU-rDNA | EnP1B | PTP2 | HSWP4 | SWP25 | SWP30 | NCER_ 100070 | NCER_ 100533 | NCER_ 101600 | NCER_ 101165 |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-----------------------|------------------|-------------------|
| Mean pairwise transition to transversion ratio, s/v | 2.86 ± 0.69 | 6.01 ± 2.29 | 2.14 ± 0.92 | 0.31 ± 0.15 | 1.53 ± 0.79 | 3.92 ± 1.47 | 5.17 ± 2.21 | ND (only transitions) | 3.86 ± 2.06 | 2.77 ± 2.16 |
| Overall transition to transversion bias, Rs/v | 4.10 | 5.46 | 3.63 | 13.02 | 8.93 | 6.86 | 4.81 | 345.8 | 4.70 | 3.56 |
| Nb of synonymous, missense, nonsense SNPs | - | 29,26,1 | 7,19,0 | 6,8,0 | 10,12,1 | 13,21,0 | 6,17,0 | 13,4,1 | 23,25,0 | 13,17,1 |
| Rejection of dN=dS in favor of dN<dS or dN>dS (p) | - | dN<dS (0.000) | dN<dS (0.101) | dN<dS (0.049) | dN<dS (0.055) | dN<dS (0.025) | dN<dS (0.340) | dN<dS (0.001) | dN<dS (0.001) | dN<dS (0.071) |
| Tajima's D (p) | -2.45 (0.000) | -0.36 (0.400) | -2.07 (0.002) | -2.49 (0.000) | -2.43 (0.000) | -1.70 (0.022) | -0.55 (0.339) | -2.43 (0.000) | -0.94 (0.186) | -1.28 (0.094) |
| Fu's FS (p) | -36.36 (0.000) | -17.18 (0.000) | -17.54 (0.000) | -12.40 (0.000) | -21.22 (0.000) | -15.77 (0.000) | -6.73 (0.009) | -9.36 (0.000) | -2.41 (0.182) | -13.58 (0.000) |
| Ramos-Onsins & Rozas's R2 (p) | 0.030 (0.000) | 0.093 (0.314) | 0.038 (0.000) | 0.043 (0.000) | 0.030 (0.000) | 0.047 (0.004) | 0.085 (0.225) | 0.051 (0.000) | 0.079 (0.251) | 0.061 (0.042) |
| Haplotype diversity (expected heterozygosity), Hd (p) | 0.985 (0.999) | 0.974 (0.999) | 0.918 (0.999) | 0.460 (0.531) | 0.849 (0.982) | 0.928 (0.990) | 0.845 (0.567) | 0.511 (0.522) | 0.617 (0.105) | 0.920 (0.822) |
| Intragenic recombination, ZZ (p) | 0.052 (0.822) | 0.062 (0.926) | -0.023 (0.395) | -0.033 (0.208) | -0.017 (0.382) | 0.002 (0.559) | 0.019 (0.657) | 0.022 (0.738) | 0.201 (0.996) | 0.096 (0.946) |
| Polymorphic pairs with significant LD w/, w/o correction (total pairs) | 69,0 (2016) | 104,29 (903) | 9,1 (300) | 3,0 (91) | 4,0 (253) | 25,5 (595) | 23,21 (231) | 5,0 (91) | 45,27 (171) | 22,10 (435) |
| Minimum number of recombination events (Rm) | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 4 | 1 |

faibles valeurs de bootstrap. Globalement, ces données suggèrent que la faible divergence génétique des isolats empêche toute tentative de génotypage avec les marqueurs sélectionnés chez *N. ceranae*, même *via* une approche *multilocus*. Ceci est également visible avec les cartes des réseaux d'haplotypes des gènes, qui ne montrent jamais de regroupements en fonction de leur origine (**Figure 30**).

A noter qu'une étude préliminaire sur deux isolats seulement avait montré des résultats similaires pour deux gènes du métabolisme codant la sous-unité alpha de la pyruvate déshydrogénase (PDH) et une hexokinase potentiellement sécrétée (Cuomo *et al.*, 2012), ainsi que pour trois gènes codant des protéines de la paroi sporale ou du tube polaire (SWP26, PTP1 et PTP4, **Tableau 2**). En comparant les séquences provenant des isolats de France et du Maroc pour ces marqueurs, aucun taxa n'avait pu être mis en évidence, et les diversités nucléotidiques intra-isolats montraient déjà de fortes valeurs.

IV.B.3. Nature des caractères polymorphiques

Les forts biais de ratios transitions/transversions suggèrent que tous les marqueurs sont soumis à des processus évolutifs. Les tests de sélection confirment cette observation, en effet, tous les marqueurs codant des protéines montrent le rejet d'au moins un test de neutralité (**Tableau 5**). Pour la majorité d'entre eux, le test de sélection basé sur les codons rejette significativement l'hypothèse nulle en faveur de l'hypothèse d'une sélection purifiante ($d_N < d_S$), suggérant des contraintes sélectives plutôt qu'un processus d'adaptation. Cependant, quatre marqueurs présentent des mutations non-sens, conduisant à une protéine certainement non-fonctionnelle, suggérant que les marqueurs pourraient être soumis à des processus évolutifs plus complexes.

EnP1B et NCER_101600 montrent d'importants événements d'insertion-délétion (*indels*) de triplets de nucléotides, qui n'introduisent donc pas de changement dans le cadre de lecture. Les *indels* d'EnP1B conduisent ainsi à une différence dans le nombre de répétitions d'un motif de 7 acides aminés (**Figure 31 et 32**). Pour NCER_101600, un motif plus complexe a été mis en évidence, contenant deux motifs répétés proches, de 14 et 16 acides aminés, ayant une base commune de 9, voire 14 résidus (**Figure 31**). Ces *indels*, pouvant atteindre des tailles très importantes jusqu'à 444 pb, génèrent une variation de la longueur des produits d'amplifications de NCER_101600. Bien que tous les allèles de tailles différentes ne soient pas présents dans nos données de séquences pour chaque isolat, les produits

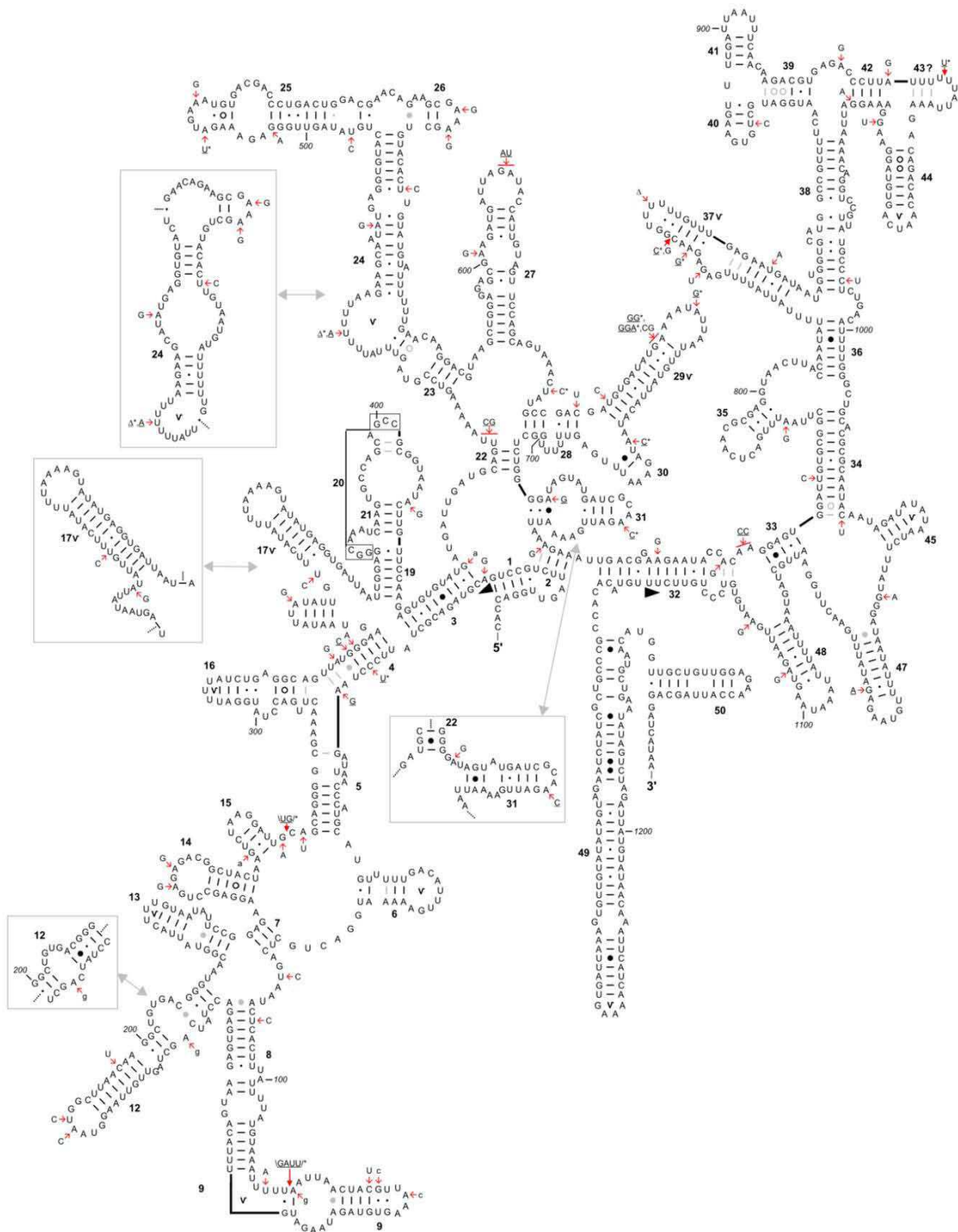


Figure 33: Modèle de structure secondaire de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique de *N. ceranae*. Les hélices communes avec les modèles procaryotes sont indiquées par des nombres. Les liaisons en gris ne sont pas présentes dans tous les modèles proposés dans la littérature. Les boîtes contiennent des structures alternatives possibles. Les deux triangles noirs indiquent le début et la fin de la région ciblée dans ce travail. Les sites variables sont indiqués par des lettres, les délétions par des triangles (Δ) et les insertions par des lettres encadrées ($\backslash xxx /$). Les lettres en majuscules, minuscules et soulignées indiquent respectivement des sites polymorphiques présents dans nos données (X), au moins deux fois dans les 88 séquences de la base de données (x), ou au moins une fois dans la base de données (\underline{X}). Les étoiles indiquent un site variable présent dans au moins 5% des séquences analysées. Le signe "v" indique des régions fortement variables dans la séquence du modèle microsporidien du CRW.

d'amplifications dominants, longs de 801 pb et 951 pb, ont été observés sur gel d'agarose pour tous les échantillons.

Parmi les sites polymorphiques observés sur les séquences du SSUrDNA, la majorité se retrouve sous formes de SNP, 70.8% et 16.7% étant respectivement des transitions et des transversions, les 12.5% restants étant des *indels*. Ces sites variables ont été localisés sur un modèle de la structure secondaire de l'ARNr de la petite sous-unité du ribosome (**Figure 33**). Les hélices sont moins porteuses de variabilité que les autres régions, et la majorité des mutations dans les hélices ne modifient pas fortement les appariements de bases, suggérant que les événements mutagènes ne sont pas aléatoires, ce qui a été confirmé par la suite par Sagastume *et al.* (2013).

IV.C. Discussion

IV.C.1. Une absence de divergence malgré la diversité de *N. ceranae*

Les études précédentes n'ayant pas permis de génotyper des souches ou des isolats de *N. ceranae* en se basant sur un seul marqueur, nous avons cherché à savoir 1) si une approche *multilocus* pouvait augmenter le pouvoir résolutif des données de diversité nucléotidique et permettrait de discriminer des populations parasites, et 2) si une part de cette diversité est déjà présente au sein même d'un isolat (*i.e.*, à l'échelle d'un individu hôte). De manière inattendue, ce travail a montré que si chacun des 10 marqueurs utilisés présente une hétérogénéité de séquences, cette diversité est déjà essentiellement présente au sein même d'une seule abeille. De plus, une faible divergence génétique a été observée entre populations parasites infectant des abeilles échantillonnées dans des sites géographiquement éloignés.

IV.C.1.1. La diversité nucléotidique des gènes de *N. ceranae*

Pour tous les gènes testés, la plupart des sites variables observés sont des singletons, c'est-à-dire des positions variables présentes une seule fois dans les données obtenues (**Tableau 4**). Cette faible redondance suggère que la diversité nucléotidique est certainement largement sous-estimée. Ainsi, les différences de valeurs de diversité observée entre les dix marqueurs (**Tableau 4**; **Figure 28**) pourraient aussi bien être dues à ce manque de données plutôt qu'à une réelle différence de leur variabilité intrinsèque.

Concernant le SSUrDNA, bien que variable chez les microsporidies, des niveaux de diversité similaires à la valeur observée dans ce travail ($\pi = 0.0045 \pm 0.0008$) ont été observés dans des régions du locus ADNr chez *N. ceranae* et plusieurs autres espèces proches incluant *N. bombycis*, *N. granulosis* et *Vairimoprha cherachis* (π allant de 0.003 à 0.009) (Ironsides, 2013; Sagastume *et al.*, 2013). De plus, une hétérogénéité dans les séquences des ADNr a également été observée chez *N. apis* et *N. bombi* (Gatehouse and Malone, 1998; Tay *et al.*, 2005; O'Mahony *et al.*, 2007), suggérant que ce fort polymorphisme pourrait être un trait commun au groupe *Nosema/Vairimorpha*.

Ce travail montre, de manière inattendue, que ce polymorphisme n'est pas restreint au locus ADNr, présent en copies multiples sur le génome, mais s'applique aussi aux gènes codant des protéines, supposés être présents en copies uniques dans le génome, avec des valeurs de π allant de 0.0010 à 0.0178 (**Tableau 4**).

EnP1B est le marqueur qui montre à la fois la plus forte diversité nucléotidique, le plus grand pourcentage de paires de sites polymorphiques dont le déséquilibre de liaison (**LD**) est

significatif, et le plus fort **R_m** (**Tableau 4 et 5**), suggérant qu'il pourrait être soumis à un processus évolutif particulier. EnP1B montre en outre des événements d'insertions-délétions correspondant à un motif peptidique répété (**Figure 31**). Chez *E. cuniculi* et *E. intestinalis*, la protéine EnP1 présente des répétitions d'un motif peptidique de fixation à l'héparine (heparin binding motif), impliqué dans l'adhésion du parasite à la surface des cellules-hôtes *in vitro* (Southern *et al.*, 2007). Si le motif d'EnP1B est lui aussi impliqué dans une telle interaction, son fort polymorphisme pourrait être alors lié à son implication dans la virulence du parasite. En effet, la maintenance du polymorphisme est une caractéristique des gènes impliqués dans les relations « gène à gène » (GFG pour « gene-for-gene ») entre un parasite et son hôte (c'est-à-dire entre gènes de l'hôte et du parasite dont les produits interagissent), notamment lors des phénomènes d'auto-infections et de maladies polycycliques, ce qui est supposé être le cas chez *N. ceranae* (Tellier and Brown, 2007). Le fait que NCER_101600 présente des *indels* et des caractéristiques similaires à EnP1B (forts π et **R_m**, plus de paires de sites avec **LD** significatif) suggère qu'il pourrait aussi être impliqué dans un mécanisme d'interaction entre l'hôte et le parasite *via* un complexe GFG, et donc dans la pathogénie de *N. ceranae*.

IV.C.1.2. L'absence de divergence entre isolats empêche leur discrimination

Bien que les populations parasitaires proviennent de régions éloignées, les faibles valeurs de **F_{ST}** et **G_{ST}** pour les différents marqueurs (**Tableau 4**) indiquent qu'aucune différenciation génétique ne peut être établie entre elles. Même la plus forte valeur de **G_{ST}** du gène NCER_101165 est insuffisante pour discriminer des isolats, malgré le regroupement des haplotypes marocains (**Figure 30**). Ce résultat est en accord avec les études précédentes sur les marqueurs ADN_r, PTP1 et PTP3 qui, elles aussi, n'ont pas permis le génotypage de parasites (Huang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2011 ; Hatjina *et al.*, 2011 ; Sagastume *et al.*, 2011). Tous ces travaux suggèrent que des abeilles géographiquement distantes sont infectées par des populations parasitaires similaires. Ainsi, bien que *N. ceranae* montre une forte diversité de séquences, celle-ci ne permet pas de discriminer des variants parasitaires, même en se basant sur l'étude simultanée de plusieurs marqueurs génétiques.

Les données de ce travail laissent aussi supposer que cette absence de divergence peut être généralisée à tous les gènes codant chez *N. ceranae*. En revanche, il n'est pas possible d'extrapoler nos résultats aux séquences non codantes de *N. ceranae*. Une étude menée sur des séquences de microsatellites par la technique d'ISSR (inter-simple sequence repeat) a récemment été présentée lors d'un congrès (Branchiccela *et al.*, Apimondia 2013), suggérant que les profils d'amplifications de ces régions sont variables. Deux amorces ont permis la

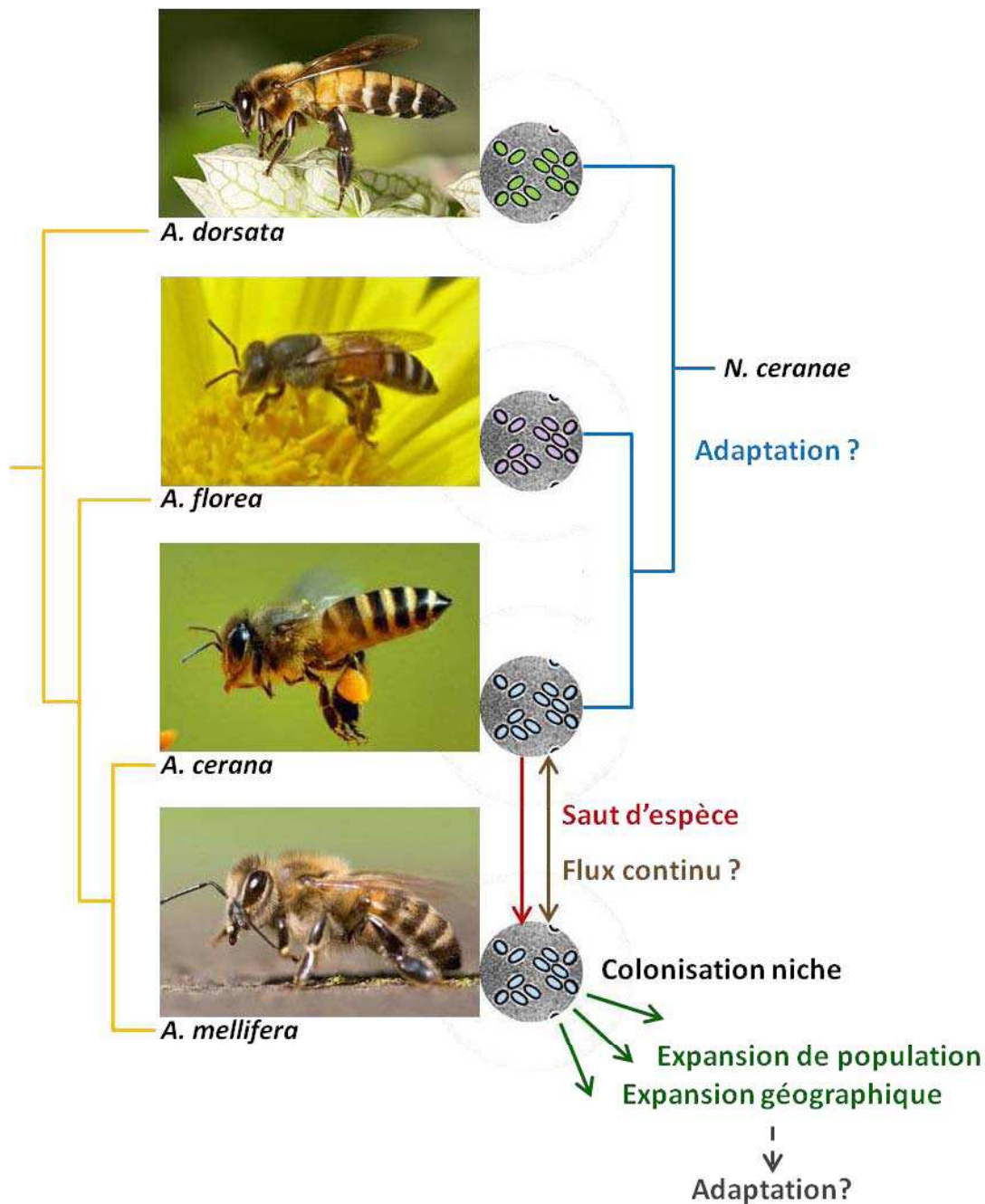


Figure 34: Hypothèse évolutive du passage de *N. ceranae* chez *A. mellifera*. *N. ceranae* est présente chez trois espèces d'abeilles asiatiques. La phylogénie de ces espèces et d'*Apis mellifera* est donnée par l'arbre jaune à gauche (Lo et al., 2010). Les données moléculaires sur le marqueur PTP1 distinguent des clades parasites infectant les trois espèces asiatiques (arbre phylogénétique bleu à droite, Chaimanee et al. 2011), suggérant des mécanismes adaptatifs. Les populations infectant *A. cerana* et *A. mellifera* ne sont pas distinctes, suggérant un saut d'espèce récent ou une absence d'isolement des parasites qui passeraient encore actuellement d'un hôte à l'autre. Les données moléculaires de ce travail suggèrent que la population de *N. ceranae* est en expansion chez *A. mellifera*, de par la colonisation de ce nouvel hôte et l'aide probable des échanges commerciaux de colonies. *N. ceranae* n'aurait pas encore eu le temps d'évoluer chez *A. mellifera*, ce qui en ferait un modèle intéressant pour observer une adaptation d'un parasite à un nouvel hôte.

différentiation de profils grâce auxquels les isolats parasites sont rassemblés dans trois clusters en fonction de leurs zones géographiques d'origine. En contraste avec nos données, il serait alors possible de faire du typage moléculaire chez *N. ceranae* sur des séquences non codantes hypervariables. Toutefois, seules deux amorces parmi toutes celles testées ont permis une telle différenciation. De plus, tous les profils ISSR obtenus avec ces amorces ne sont pas groupés et les trois groupes obtenus sont chevauchants, suggérant que cette approche ne semble pas non plus très discriminante.

IV.C.1.3. Indices sur l'évolution de *N. ceranae* chez *A. mellifera*

Afin de comprendre ce phénomène, différents indices ont été utilisés pour voir s'il était possible de retracer une histoire évolutive du parasite. Les valeurs significatives de R_2 et les valeurs significativement négatives de D et surtout de F_S (qui est significativement négatif pour presque tous les marqueurs sauf NCER_101600; **Tableau 5**) sont caractéristiques d'une population en expansion (Ramirez-Soriano *et al.*, 2008). La très faible divergence entre populations, observée *via* le F_{ST} et G_{ST} (**Tableau 4**) et les topologies des arbres (**Figure 29**), suggère qu'une telle expansion aurait émergé d'une population initiale déjà peu divergente. Ces résultats sont concordants avec l'hypothèse d'un saut d'espèce de *N. ceranae* depuis son hôte d'origine, l'abeille asiatique *A. cerana*, vers le nouvel hôte *A. mellifera* lors d'un rapprochement récent entre les deux hôtes (Klee *et al.*, 2007). Ce travail suggère qu'à la suite de ce saut d'hôte, *N. ceranae* a connu - et connaîtrait encore - une expansion de sa population correspondant à la colonisation de cette nouvelle niche. Cette expansion pourrait aussi être liée à son expansion géographique, renforcée par les échanges intercontinentaux de colonies (Sumner and Boriss, 2006).

Chaimanee *et al.* (2011) ont montré que la diversité nucléotidique du gène *ptp1* permet de différencier des taxa parasites de *N. ceranae* spécifiques d'*A. florea* et d'*A. dorsata*, mais qu'aucune distinction ne peut être faite entre les isolats provenant d'*A. mellifera* et *A. cerana*. Si, comme nos données le suggèrent, la population de *N. ceranae* présente chez *A. mellifera* est issue d'une population faiblement divergente, plusieurs hypothèses peuvent alors être formulées (**Figure 34**). D'une part, seule une petite population aurait pu effectuer un saut d'hôte. L'absence de divergence entre les séquences parasites des isolats des deux espèces hôtes et l'absence d'indices de dérive suggéreraient alors que le saut d'hôte est effectivement très récent et que la population de parasites chez l'abeille européenne n'a pas eu le temps de diverger (ni de s'adapter). Une autre hypothèse est que l'absence de divergence entre les populations présentes chez les deux hôtes est due à l'absence de leur isolement génétique,

c'est-à-dire que des échanges parasitaires seraient toujours en cours entre les deux espèces hôtes. Un tel flux parasitaire paraît tout à fait possible si les deux hôtes occupent des zones communes, ce qui est probable.

IV.C.2. Localisation cellulaire de la diversité chez *N. ceranae*

Les indices de diversité nucléotidique ont montré que la majeure partie de la variabilité observée se retrouve déjà au sein des isolats. La dimension même de l'isolat, qui comprend une population de parasites, ne permet cependant pas de savoir quel est le compartiment biologique où cette diversité est localisée. Deux hypothèses non exclusives peuvent alors être proposées: la diversité de *N. ceranae* dans un individu hôte pourrait refléter 1) la diversité d'une population de cellules parasitaires à génotypes variables (c'est-à-dire que l'abeille serait infectée par une population variable de parasites) ou 2) une diversité allélique intracellulaire (c'est-à-dire que les séquences étudiées seraient présentes en copies multiples et non identiques au sein d'une même cellule, à l'instar de ce qui a été proposé pour le locus ADN_r). Dans les deux cas, l'origine et la maintenance de la diversité restent énigmatiques et méritent d'être discutées, même si seulement quelques suppositions peuvent être avancées étant donné le manque de données expérimentales, lui-même lié aux limites des outils disponibles pour l'étude des microsporidies.

IV.C.2.1. Une co-infection par de multiples variants semble improbable

Il a été montré chez *Daphnia magna* qu'une infection d'un même individu par plusieurs microsporidies de l'espèce *Octosporea bayeri*, dont les génotypes diffèrent, peut affecter les relations entre ces deux organismes au profit de la virulence et du développement parasitaire (Vizoso and Ebert, 2005). Néanmoins, et en accord avec Sagastume *et al.* (2011), il est difficilement concevable que des abeilles géographiquement distantes soient toutes infectées par exactement les mêmes populations génotypiques d'individus. De plus, si une telle co-infection était effective, on pourrait s'attendre à ce que la diversité des génotypes ne soit pas maintenue à l'identique lors du développement parasitaire, avec des génotypes devenant majoritaires, ce qui n'est observé ni dans nos résultats ni dans ceux de Sagastume *et al.* (2011).

Il est important de noter que le rejet de l'hypothèse de la co-infection ne rejette pas celle de la présence d'une population variable de parasites au sein de l'hôte pour peu qu'il

existe des mécanismes (mutations, recombinaisons, Cf. IV.C.3.) engendrant continuellement et fréquemment de la diversité lors du développement parasitaire.

IV.C.2.2.. La méconnaissance de la ploïdie de *N. ceranae*

Le locus ADN_r est présent en multiples copies dans le génome de *N. ceranae*. Lors de l'assemblage du génome du parasite, Cornman *et al.* (2009) ont comptabilisé 46 contigs contenant des séquences ADN_r, sans pour autant avoir pu assembler une seule version complète du locus à cause de son abondant polymorphisme que les auteurs supposent, au moins en partie, du à sa diversité intrinsèque. La diversité nucléotidique de ce marqueur pourrait donc être due à des variations intra-génomique des différentes copies, ce qui a par ailleurs été observé au sein d'une unique spore de *N. bombi* (O'Mahony *et al.*, 2007).

Dans ce travail, le marqueur SSUrDNA n'a pas montré une diversité nucléotidique plus importante que les autres marqueurs (**Figure 28, Tableau 4**). Il est alors judicieux de se demander si tous les gènes ne seraient pas présents en plusieurs copies polymorphiques dans la cellule parasitaire, questionnant ainsi la ploïdie de *N. ceranae*. Cette espèce microsporidienne, comme beaucoup d'autres, comprend 2 noyaux (Chen *et al.*, 2009). Bien que ni la ploïdie des deux noyaux (et donc des cellules) ni l'existence d'un stade de développement où les noyaux fusionneraient ne soient connus, la cellule parasitaire peut donc être considérée comme au moins diploïde, c'est à dire avec au moins deux allèles de chaque gène. Les valeurs d'hétérozygotie (**Hd, Tableau 5**) obtenue dans ce travail sont d'ailleurs proches, pour la plupart des gènes, de celles attendues pour un organisme diploïde (Nei, 1973).

L'observation de mutations modifiant le cadre de lecture (*indels* d'un nucléotide pour les gènes NCER_1000070 et NCER_100533, **Tableau 4**) et de mutations non-sens induisant un codon de terminaison de la traduction (dans les gènes EnP1B, SWP25, NCER_100533, NCER_101165) supporte l'hypothèse de la présence de copies multiples des gènes de *N. ceranae*. En effet, l'inactivation d'un gène peut ne pas être délétère si une copie active de ce gène existe ailleurs dans le patrimoine génétique de la cellule. La polyploïdie permet ainsi l'accumulation de mutations dans des gènes inactifs, amenant à une pseudogénisation, tout en maintenant des copies fonctionnelles sous pression de sélection (Otto, 2007).

Sagastume *et al.* (2011) ont en outre émis l'hypothèse que *N. ceranae* pourrait avoir un stade de son cycle de vie où deux cellules parasitaires fusionneraient, permettant à la ploïdie des noyaux de doubler et autorisant ainsi des événements de recombinaison. La polyploïdie de

N. ceranae serait alors transitoire et liée à un mode de vie sexué (Cf. IV.C.3). Néanmoins, aucune donnée n'a permis l'observation de tels stades transitoires.

IV.C.3. Origine et maintenance de la diversité chez *N. ceranae*

Quelle que soit la localisation de la diversité (inter- ou sub-cellulaire), on peut s'interroger sur les processus qui créent et maintiennent cette diversité. La forte diversité en allèles présents dans chaque isolat de *N. ceranae* (Tableau 4) pourrait être liée à une combinaison de stades nucléaires non-haploïdes, des événements de recombinaison et/ou des échanges de gènes, ainsi qu'à des événements de mutations.

IV.C.3.1. Indices de l'existence d'événements de recombinaison

Sagastume *et al.* (2011) ont ouvert la discussion sur l'existence de stades non-haploïdes et de recombinaisons en se basant sur les mêmes indices de recombinaison (**LD**, **R_m**) que ceux utilisés dans ce travail. Sur les dix marqueurs étudiés ici, bien que les indices **ZZ** obtenus ne soient pas significatifs, d'autres tests (paires de sites polymorphiques avec **LD** significatif, **R_m**, Tableau 5) semblent néanmoins indiquer que des événements de recombinaison expliquent en partie la diversité allélique observée, en particulier pour EnP1B et NCER_101600. L'évaluation plus complète de la diversité génomique intra-spécifique de *N. ceranae* et d'autres microsporidies pourrait permettre de confirmer l'importance des événements de recombinaison et de comparer les fréquences de ces événements entre différentes espèces. Les phénomènes de recombinaison impliquent des échanges génétiques (cross-overs) entre les génomes de deux cellules ou d'une même cellule, posant ainsi la question du mode de reproduction du parasite.

IV.C.3.2. Sexualité chez *N. ceranae* et les microsporidies

Selon les espèces microsporidiennes, le mode de reproduction serait sexué ou asexué. Une reproduction sexuée impliquerait le plus souvent une alternance entre une mérogonie diplocaryotique (cellulairement diploïde) et une sporogonie monocaryotique (cellulairement haploïde) résultant d'une méiose. Chez les groupes *Nosema/Vairimorpha*, ce mode de reproduction serait ancestral et aurait été perdu à une ou plusieurs reprises, notamment chez les *Nosema* qui semblent avoir perdu le stade monocaryotique au profit d'une vie entièrement diplocaryotique et sans méiose (Ironsides, 2007; Lee *et al.*, 2008b).

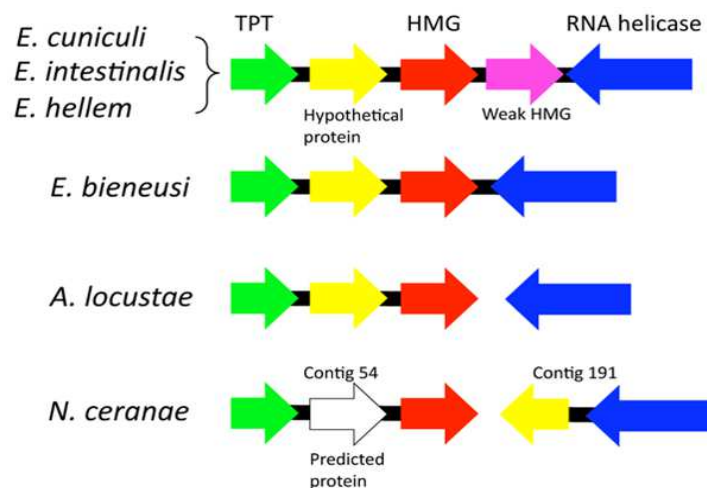


Figure 35 : Loci microsporidiens liés à la détermination sexuelle chez les champignons. *E. cuniculi*, *E. intestinalis* et *E. hellem* partagent la même organisation du locus, contenant les gènes TPT (Triose Phosphate Transorptter), HMG (High Mobility Group), un second HMG avec une faible identité de séquence par rapport au premier ("weak HMG"), et le gène de l'hélicase à ARN. Le gène "weak HMG" n'est pas présent dans d'autres espèces telles que *E. bienewisi*, *A. locustae* et *N. ceranae*. Concernant ces deux derniers, le gène de l'hélicase à ARN n'est pas sur le même locus que les deux autres gènes, et, chez *N. ceranae*, un ORF prédit de fonction inconnue viendrait s'ajouter à l'architecture (en blanc). Une protéine putative est aussi prédite dans le locus de toutes les espèces (en jaune). (Tiré de Lee et al., 2010)

| EUKARYOTES | | Spoll | Mre11 | Rad50 | Hop1 | Hop2 | Mnd1 | Rad52 | Dmc1 | Rad51 | Msh4, Msh5 | Msh2, Msh6 | Mlh1 | Mlh2 | Mlh3 | Pms1 |
|------------|-------------------------------|-------|-------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------------|------------|------|------|------|------|
| PROTISTS | <i>Giardia</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Trypanosoma/Leishmania</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Entamoeba</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Plasmodium</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ANIMALS | <i>Homo</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Mus</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Drosophila</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Anopheles</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Caenorhabditis</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| FUNGI | <i>Saccharomyces</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Schizosaccharo.</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Neurospora</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Encephalitozoon</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Nosema ceranae</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Aspergillus niger</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Tableau 6 : Distribution de gènes associés à la méiose chez des eucaryotes. Les gènes démontrés pour être impliqués uniquement dans la méiose (par des approches d'inactivation) sont surlignés en gris. La présence (+) d'homologues a été vérifiée par BLASTn (n) ou BLASTp (P) à partir des séquences disponibles sur le site du NCBI, en compilant les résultats de Ramesh *et al.* (2005) et des recherches sur *N. ceranae* et *Aspergillus niger*. Les gènes absents de la base de données sont indiqués par un signe moins (-), et les données manquantes ou imprécises (données génomiques incomplètes) sont laissées vides ou mises entre parenthèses. (Adapté de Ramesh *et al.*, 2005)

Il manque cependant des données expérimentales solides prouvant définitivement que des microsporidies peuvent avoir un mode de vie sexué. Les seules données expérimentales sérieuses concernent la méiose, avec l'observation de complexes synaptonémaux lors de la transition vers la mérogonie pour les espèces à spores monocaryotiques (Vávra and Larsson, 1999). De tels complexes ont en outre été observés chez des espèces monocaryotiques et diplocaryotiques, notamment *Nosema rivulogammari* (parasite d'un amphipode), suggérant que si la sexualité existe chez les microsporidies, elle se déroule selon plusieurs modalités. Il manque cependant des données claires concernant la ploïdie des noyaux et l'existence d'interactions entre ceux-ci ou entre cellules parasitaires.

Les nombreuses données génomiques apportent quelques indices nouveaux. Chez les zygomycètes, le type sexuel est déterminé par un seul gène retrouvé sous 2 isoformes, SexM ou SexP, codant une protéine portant un domaine HMG (High-Mobility Group). Il est entouré par deux gènes, codant pour un transporteur de triose-phosphate (TPT) et une hélicase à ARN, formant ainsi le locus MAT (pour Mating Type; Thomas and Travers, 2001). Un locus similaire a été découvert dans des génomes microsporidiens, dont celui de *N. ceranae* (**Figure 35**) (Lee *et al.*, 2010). Le gène microsporidien codant la protéine HMG semble ne se trouver que sous une seule forme, mais il comporte deux domaines HMG au lieu d'un seul pour SexP et SexM. Ainsi, le matériel moléculaire permettant la différenciation de types sexuels semble présent mais la reproduction sexuée serait plutôt homothallique (deux types de gamètes produits par un même individu). Un autre argument en faveur d'un mode de reproduction sexué serait la présence de gènes homologues à ceux impliqués dans la méiose chez les autres eucaryotes (Ramesh *et al.*, 2005). Le séquençage du génome de *N. ceranae* a permis d'identifier des ORF correspondant à une partie de ces gènes (**Tableau 6**). En revanche, il n'est pas possible de conclure sur la présence d'une méiose en se basant uniquement sur l'observation de ces homologues. En effet, plusieurs gènes sont absents chez *Drosophila spp.* alors que la méiose y est connue, et certains homologues sont présents chez le champignon asexué *Aspergillus niger* (Wadman *et al.*, 2009).

Dans l'hypothèse inverse, c'est-à-dire dans le cas d'une asexualité de *N. ceranae*, l'existence d'évènements de recombinaison entre différentes copies d'un locus impliquerait l'existence de stades transitoires polyploïdes, lors desquels des échanges de matériels génétiques pourraient avoir lieu. Ce type de cycle de vie clonal et asexué expliquerait la forte hétérozygotie et le faible F_{ST} puisqu'il résulterait dans une population allélique similaire chez différents isolats et conduirait à de fausses topologies phylogénétiques (Birky, 1996; Haag *et al.* 2013). Cependant, cela devrait aussi conduire à un fort déséquilibre de liaison (**LD**), ce qui

Tableau 7: Identifiants des protéines d'*E. cuniculi* et *N. ceranae* homologues à celles impliquées dans les voies de réparations chez *S. cerevisiae* selon Gill et Fast (2007). Les voies de réparations des mésappariements (mismatch repair), d'excision de bases (base excision repair) et d'excision de nucléotides (nucleotide excision repair) opèrent en éditant les bases ou nucléotides aberrants d'un des brins de l'hélice, en utilisant le second comme matrice. La réparation par méthyltransférase supprime les groupes méthyles sans toucher à la structure hélicoïdale. Les réparations par recombinaison homologue (homologous recombination repair) et par ligation de fragments non homologues (Non-homologue End-joining) sont des voies de réparation des cassures double brins. Les données obtenues dans ce travail apparaissent en gras. Les identifiants des protéines n'ayant que le domaine fonctionnel attendu apparaissent entre parenthèses.

| Gene | <i>S. cerevisiae</i> | <i>E. cuniculi</i> | <i>N. ceranae</i> | Gene | <i>S. cerevisiae</i> | <i>E. cuniculi</i> | <i>N. ceranae</i> |
|-----------------------------------|----------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------------|----------------------|--------------------|-------------------|
| Mismatch Repair | | | | Homologous recombination | | | |
| Exo1 | NP_014676 | CAD25986 | EEQ82140 | Mre11 | BAA02017 | CAD26648 | EEQ81592 |
| Mlh1 | NP_013890 | CAD26547 | EEQ83087 | Rad50 | CAA65494 | CAD25593 | EEQ82874 |
| Msh2 | CAA99102 | CAD26200 | EEQ82644 | Rad51 | CAA45563 | CAD25992 | EEQ82810 |
| Msh6 | NP_010382 | NP_586186 | EEQ81696 | Rad52 | CAA86623 | CAD27066 | EEQ82846 |
| PCNA | AAS56041 | NP_597446 | EEQ83080 | Rpa1 | NP_009404 | CAD25779 | EEQ82914 |
| Pms1 | P14242 | NP_586432 | EEQ82585 | Rpa2 | NP_014087 | CAD25396 | EEQ82336 |
| Msh3 | CAA42247 | CAD25790 | EEQ81696 | Sgs1 | NP_013915 | CAD25646 | EEQ82903 |
| Base Excision Repair | | | | Ras55 | BAA01284 | - | EEQ82745 |
| Apn1 | CAA81954 | CAD26065 | EEQ83096 | Rad57 | NP_010287 | - | EEQ82745 |
| Apn2 | NP_009534 | CAD25496 | | Xrs2 | BAC80248 | - | - |
| Mag1 | NP_011069 | CAD25924 | | Ddc1 | NP_015130 | - | - |
| | | /CAD26679 | | Hpr5 | CAA89385 | - | - |
| Mus81 | NP_010674 | CAD25168 | EEQ82523 | Mec3 | NP_013391 | - | - |
| Ntg1 | NP_009387 | CAD26394 | EEQ81746 | Rad17 | CAA99699 | - | - |
| Ogg1 | NP_013651 | CAD26383 | EEQ82543 | Rad24 | P32641 | - | - |
| PCNA | AAS56041 | CAD26623 | EEQ83080 | Rad54 | CAA88534 | - | - |
| Rad1 | P06777 | CAD26381 | EEQ82544 | Rdh54 | CAA85017 | (CAD24904) | (EEQ83063) |
| Rad10 | CAA86642 | CAD25852 | EEQ82008 | Non Homologous End Joining | | | |
| Rad27 | CAA81953 | CAD26252 | EEQ82140 | Mre11 | BAA02017 | CAD26648 | EEQ81592 |
| Ung1 | CAA86634 | CAD25772 | EEQ82873 | Rad27 | CAA81953 | CAD26252 | EEQ82140 |
| Xrcc1 | P32372 | CAD25161 | EEQ82733 | Rad50 | CAA65494 | CAD25593 | EEQ82874 |
| Cdc9 | CAA48158 | CAD25151 | EEQ82740 | Lif1 | NP_011425 | | |
| Ddc1 | NP_015130 | | | Xrs2 | BAC80248 | | |
| Mec3 | NP_013391 | | | Ddc1 | NP_015130 | | |
| Mms4 | NP_009656 | | | Dnl4 | CAA99193 | CAD25151 | EEQ82740 |
| Rad17 | CAA99699 | | | Mec3 | NP_013391 | | |
| Nucleotide Excision Repair | | | | Ku70 | NP_014011 | | |
| Rad1 | P06777 | CAD26381 | EEQ82544 | Ku80 | NP_013824 | | |
| Rad2 | CAA97287 | CAD27134 | EEQ81863 | Rad17 | CAA99699 | | |
| Rad3 | CAA46255 | NP_585776 | EEQ82054 | DNA polymerases | | | |
| Rad4 | CAA39375 | (CAD24914) | | α Pol1 | AAZ22505 | CAD26619 | EEQ83074 |
| Rad10 | CAA86642 | CAD25852 | EEQ82008 | α Pol2 | NP_009518 | CAD25827 | EEQ82664 |
| Rad14 | P28519 | NP_586232 | | α Pri1 | AAT92878 | CAD26368 | EEQ82289 |
| Rad25 | Q00578 | CAD24977 | EEQ82285 | α Pri2 | NP_012879 | CAD26641 | EEQ82002 |
| Rad26 | CAA57290 | (CAD27013) | EEQ82969 | δ Pol3 | CAA43922 | CAD27015 | EEQ82248 |
| Rpa1 | NP_009404 | CAD25779 | EEQ82914 | δ Hys2 | NP_012539 | CAD27050 | EEQ81388 |
| Rpa2 | NP_014087 | CAD25396 | EEQ82336 | ε Dpb2 | NP_015501 | NP_597373 | - |
| SSL1 | CAA97527 | CAD25215 | EEQ83145 | ε Pol2 | NP_014137 | CAD25840 | EEQ83015 |
| Tfb2 | AAB40628 | CAD24937 | EEQ82366 | β Pol4 | NP_009940 | | |
| Tfb3 | AAB64899 | CAD25932 | EEQ83166 | γ Mip1 | NP_014975 | | |
| Tfb4 | NP_015381 | CAD25620 | | η Rad30 | NP_010707 | | EEQ81545 |
| Rad7 | CAA89580 | | (CAA85071) | ξ Rev3 | NP_015158 | CAD27015 | EEQ82248 |
| Rad16 | CAA85071 | (CAD27013) | EEQ82729 | ξ Rev7 | AAA98667 | | |
| Rad23 | AAB28441 | | | Rev1 | CAA99674 | | |
| Tfb1 | AAB64747 | | | | | | |
| Methyltransferase Repair | | | | | | | |
| Mgt1 | CAA42920 | | | | | | |

n'est pas le cas dans les résultats de notre travail pour lesquels aucune valeur de *ZZ* n'est significative (**Tableau 5**). Néanmoins, et comme déjà évoqué, le manque de données peut empêcher la réelle estimation des événements de recombinaison.

Dans tous les cas, il est important de rappeler l'absence de preuves irréfutables d'un mode de vie sexué ou asexué chez les microsporidies, et de *N. ceranae* en particulier, les caractères moléculaires précédemment cités pouvant n'être que des reliques provenant d'un ancêtre sexué. Pour paraphraser Cali et Takvorian (1999) « les microsporidies sont à la fois diverses et énigmatiques au regard de la ploïdie, de la présence de divisions méiotique et de l'interaction entre les paires de noyaux diplocaryotiques ».

IV.C.3.3. Mutations et mécanismes de réparation de l'ADN

L'hypothèse précédente stipule l'existence d'événements de recombinaisons qui expliqueraient les échanges de sites polymorphiques mais il faut aussi discuter de l'origine de ces sites variables. Naturellement, des modifications nucléotidiques sont induites de façon aléatoire lors de la réplication non parfaite d'un génome par les polymérases (environ 1 erreur sur 10 000 bases répliquées). La ploïdie peut aussi influencer sur la probabilité d'apparition de mutations puisque plus elle est forte, plus le taux de mutations sera important (Otto, 2007).

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la réparation de ces altérations génétiques et les gènes impliqués peuvent être séparés en groupes conservés chez les eucaryotes (**Tableau 7**) (Fleck and Nielsen, 2004). En recherchant chez *E. cuniculi* des homologues aux protéines de *Saccharomyces cerevisiae* impliquées dans ces différentes voies de réparation, Gill and Fast (2007) ont observé une réduction apparente du nombre de ces protéines, et principalement de celles réparant les cassures doubles brin, les amenant à supposer que toutes les voies de réparations pourraient être moins efficaces chez *E. cuniculi* que chez *S. cerevisiae*. En reproduisant cette approche avec les données du génome de *N. ceranae*, on retrouve, avec quelques variations, les mêmes homologues que chez *E. cuniculi* (**Tableau 7**), suggérant une capacité de réparation similaire chez ces deux microsporidies. Il est alors difficile d'affirmer que la diversité intra-spécifique observée chez *N. ceranae* serait due à des voies de réparation moins efficaces puisqu'une telle diversité n'a jamais été observée chez *E. cuniculi*. Les protéines identifiées sont de plus toutes impliquées dans d'autres fonctions cellulaires (telle que la méiose), rendant difficile toute interprétation quand à leur présence ou absence. Surtout, il n'existe pas de données expérimentales permettant d'estimer le taux de mutations de *N. ceranae*, et des microsporidies en général.

IV.D. Conclusion

Ce premier volet de thèse a montré que, pour plusieurs gènes codants, la diversité intra-isolat et l'absence de divergence entre isolats empêchent le génotypage chez *N. ceranae*. Si cela semble valable pour toutes les séquences codantes, il est aussi nécessaire d'étudier des régions non codantes, une approche déjà initiée par Branchiccela *et al.* (Apimondia 2013), avant d'étendre ce phénomène à l'ensemble du génome. Même si plusieurs hypothèses ont été présentées pour expliquer l'origine et la maintenance de la diversité intra-isolat, et que des approches à haut-débit permettraient de mieux la quantifier, aucune donnée ne permet actuellement de les tester. Afin de savoir si cette variation nucléotidique est présente dans une seule cellule parasitaire, il est possible de répéter l'expérience réalisée par O'Mahony *et al.* (2007) chez *N. bombi*, en comparant les séquences de plusieurs marqueurs au sein d'une seule spore de *N. ceranae*. Par contre, pour savoir si ce polymorphisme trouve son origine dans des cellules parasitaires polymorphiques, qui pourraient en outre s'échanger du matériel génétique, des approches culturelles seront nécessaires. Des cultures de cellules intestinales d'abeilles sont en développement dans différents laboratoires, dont le LMGE. Elles permettront de disposer d'un moyen utile d'isolement de souches parasitaires, qui pourront alors être comparées. De même, des cultures parasitaires permettraient de suivre l'éventuelle apparition de diversité au sein d'une culture clonale, et donc de comparer le taux de mutation entre *N. ceranae* et d'autres microsporidies cultivées, dont le génome est connu et qui ne semblent pas montrer de diversité intra-isolat comme *E. cuniculi* et *Anncalia algerae* (parasite du moustique).

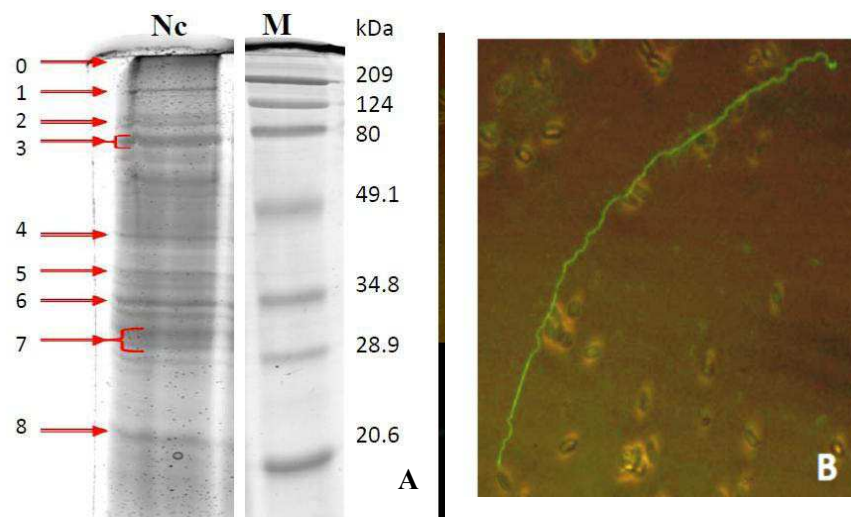


Figure 36 : Production d'anticorps contre *Nosema ceranae*. **A.** Séparation par condition dénaturante (SDS-PAGE) des protéines insolubles extraites de spores purifiées de *N. ceranae* (M: marqueur de taille). Les bandes numérotées de 1 à 8 ont été découpées et injectées à des souris pour produire des anticorps. Un seul antisérum permet un marquage spécifique. **B.** Immunomarquage en IFA du tube polaire après extrusion avec les anticorps produits contre la bande 3 (des données de spectrométrie de masse suggèrent que cet anticorps reconnaîtrait la protéine PTP3). Source: F. Delbac et R. Fontbonne (LMGE), communication personnelle.

V- Recherche de facteurs de virulence et localisation subcellulaire de protéines de *N. ceranae*

N. ceranae provoque de nombreux effets délétères chez les abeilles, aussi bien au niveau de l'individu que de la colonie (Cf. II.D.2.). Si la variation de sa virulence ne semble pas principalement liée au polymorphisme du parasite (Cf. Chapitre IV), sa pathogénie doit pourtant bien reposer sur des déterminants génétiques. Au laboratoire, la réponse de l'abeille à une infection par *N. ceranae* est étudiée par des approches "omiques" globales (transcriptome et protéome intestinaux, métabolome de l'hémolymph) mais peu d'indices ont été mis en évidence pour expliquer comment le parasite affecte l'abeille, montrant notre méconnaissance des facteurs de virulence qui interviennent et qui interagissent avec l'hôte. Cette approche fonctionnelle est généralement déclinée de deux manières chez les microsporidies, pour lesquelles il faut rappeler la difficulté d'étude due à leur développement intracellulaire.

L'approche ascendante, consistant à identifier expérimentalement des éléments qui servent ensuite à prédire un phénotype, a été largement utilisée chez les microsporidies pour identifier les protéines sporales. Des méthodes d'extraction et d'enrichissement ont ainsi été mises au point, permettant d'identifier nombre de protéines du tube polaire (PTP) et de la paroi sporale (EnP, SWP), connues pour être très insolubles. Wu *et al.* (2008) ont par exemple identifié des SWP potentielles de *N. bombycis* à partir d'un extrait de protéines insolubles, certaines ayant ensuite été confirmées et localisées par des approches moléculaires (Wu *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2009). Au laboratoire, des extraits de protéines sporales de *N. ceranae* ont été obtenus et injectés à des souris pour la production d'antisera. Ces antisera étant dirigés contre un ensemble de protéines, ils sont généralement peu spécifiques (**Figure 36**). De plus, cette approche est limitée à l'étude des protéines constituant la spore, seul stade où il est possible de travailler sur les déterminants parasitaires uniquement (c'est-à-dire sans protéines provenant de l'hôte).

Le séquençage du génome de *N. ceranae* (Cornman *et al.*, 2009) a permis d'avoir accès au contenu génétique global du parasite. Pour ce travail, nous avons mis en place une approche descendante, où les potentiels acteurs moléculaires impliqués dans la virulence ont d'abord été recherchés au sein de l'ensemble des gènes prédits, pour ensuite tenter d'identifier leur rôle dans la pathogénie. Cette approche implique une part de risque puisque que les cibles

sont choisies *a priori*: rien ne prouve leur présence ou leur rôle effectifs. Par contre, elle permet de s'affranchir de la limitation due au développement intracellulaire du parasite.

L'objectif de ce travail a donc été d'identifier des facteurs de virulence potentiels dans le génome de *N. ceranae* et de les localiser au niveau de la spore ou de stades intracellulaires. Ce travail s'est déroulé en plusieurs étapes.

Dans un premier temps, des protéines de *N. ceranae* homologues à des protéines impliquées dans les phénomènes de virulence chez d'autres espèces microsporidiennes ont été recherchées. D'autres protéines, sans homologues de fonction connue, ont été choisies sur divers critères, notamment la présence de domaines fonctionnels d'intérêts. Dans un second temps, des portions de gènes codant les protéines sélectionnées ont été clonés et exprimés en système hétérologue. L'objectif était de produire des protéines recombinantes pour leur purification et/ou leur injection à des souris afin de produire des anticorps. Enfin, les techniques d'immunomarquage par épifluorescence devaient permettre de localiser les protéines parasitaires sur des coupes d'intestins d'individus infectés par *N. ceranae*. Ceci permet de savoir si les protéines sont exprimées, dans quel compartiment, et à quel stade de développement, intra ou extracellulaire.

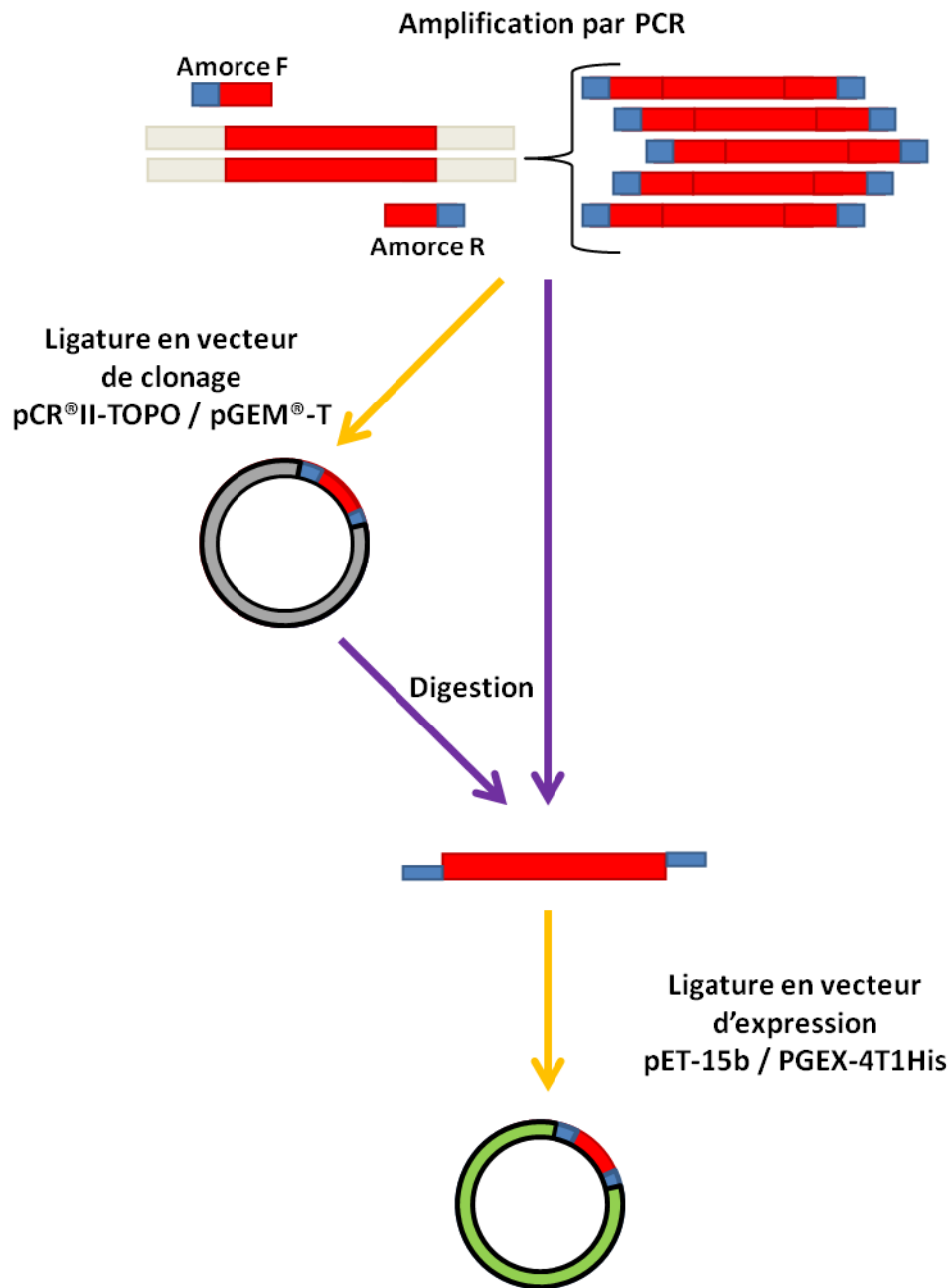


Figure 37 : Stratégie expérimentale pour la production de protéines de fusion. Après une étape d'amplification par PCR avec des amorces portant des sites de restriction, les produits ont été insérés (flèches jaunes en haut) dans des vecteurs de clonage qui permettront la production de plasmides portant les inserts. Les vecteurs de clonage, ou parfois les produits de PCR, ont subi une étape de digestion par des enzymes de restriction (flèches violettes). Les extrémités cohésives compatibles ont permis la ligature des fragments dans les vecteurs d'expression, eux-mêmes digérés. Les amorces ont été dessinées pour permettre une insertion des fragments codant en phase avec l'ORF démarrant sur le vecteur d'expression, ce qui a été vérifié par séquençage.

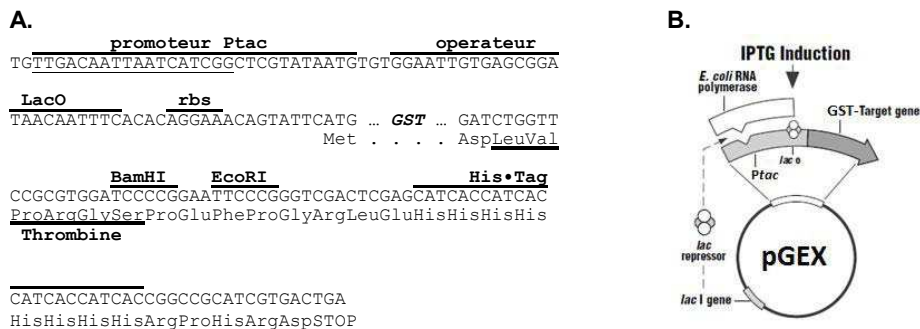


Figure 38 : Expression en système pGEX. **A.** Région de clonage du plasmide pGEX-4T1His (rbs: site de fixation du ribosome). Le clonage en phase sur les sites *Bam*HI et *Eco*RI permet de produire une protéine portant un domaine glutathione-S-transférase (GST) N-terminal, qui peut être clivée par la thrombine, et une étiquette histidine (His•Tag) C-terminale. **B.** Activation de l'expression en présence d'IPTG. En absence d'IPTG, le répresseur *LacI*^q se fixe sur l'opérateur *lacO* du promoteur *Ptac*, bloquant la transcription sur le plasmide par l'ARN polymérase bactérienne. L'IPTG, en se liant à *LacI*^q, lève cette répression, permettant l'expression et la synthèse de la protéine de fusion. (D'après GST Gene Fusion System Handbook, GE Healthcare).

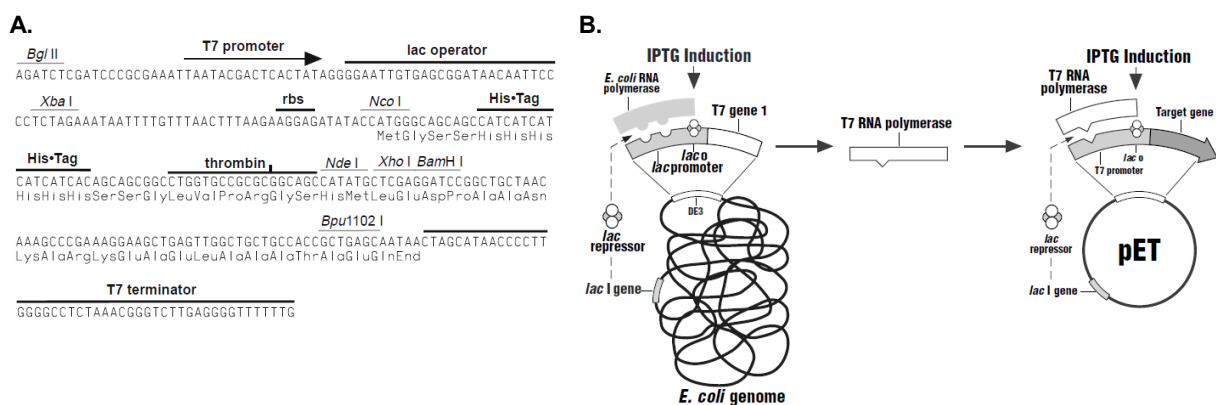


Figure 39 : Expression en système pET. **A.** Région de clonage du plasmide pET-15b (rbs: site de fixation du ribosome). Le clonage en phase sur le site *Nde*I permet de produire une protéine portant une étiquette histidine (His•Tag) qui peut être clivée par la thrombine. **B.** Activation de l'expression en présence d'IPTG. Le plasmide est introduit dans une souche d'*E. coli* porteuse du locus DE3, qui contient le gène codant l'ARN polymérase du batériophage T7 sous le contrôle du promoteur *lacUV5*. En absence d'IPTG, le répresseur *LacI*^q se fixe sur l'opérateur *lacO* du promoteur, bloquant la transcription par l'ARN polymérase bactérienne. *LacI*^q se fixe également sur le promoteur T7 du plasmide, empêchant un niveau basal d'expression. L'IPTG, en se liant à *LacI*^q, lève cette double répression, permettant l'expression et la synthèse de l'ARN polymérase T7 puis l'expression et la synthèse de la protéine de fusion codée sur le plasmide. (D'après le pET System Manual, 11th ed., Novagen).

Tableau 8 : Cadres de lecture choisis et amorces utilisées lors des amplifications en vue des clonages en vecteur d'expression. Les portions d'amorces en minuscules correspondent aux sites de restrictions ajoutés et ne s'hybrident pas sur le génome de *N. ceranae*.

| ORF (NCER_) | Amorces pour clonage en pET-15b | Amorces pour clonage en pGEX-4T1His |
|-------------------|---|---|
| 100064 (SWP25) | Nc0064F gagcatatgGGTTTATGTAGCATTGAGGATGC Nc0064R tcggatccTGCTGGCATAACAAGTTCCATC | |
| 100070 | Nc0070F+N ccacatatGCCGGCAACAAAACCTATC Nc0070R+B ctggatcCGTTACTGGCATCACTGTTGG | pgex-MAP4-F cgggatccACACCGCTAAATAAGACAC pgex-MAP4-R cggaattcTTTGGTGGTCGGCTTTGTCA |
| 100083 (PTP3) | Ncer100083F+N cctcatatgCACGTAGCTACAGCGCACAGC Ncer100083R+B atggatCCAAGGAGTCTGGTGTAAATGTTCC | |
| 100290 | Ncer100290F+N ctgcatatgATACATTTAGATGAGCAGACATTGC Ncer100290R+B gtggatccTTACCAATCAAGTTGTTCTTTACTG | pgex-pSa-F cgggatccGCAGTGGAGTCGATTGAGA pgex-pSa-R cggaattcAGGTGCTAATAAACCAACCCCA |
| 100295 (SWP26) | NcSWP26Bam cgggatccGACCTTGACCCATTCTGG NcSWP26Eco cggaattcCTTCTTTTCAACGGTTGC | |
| 100533 | Nc0533F+N aagcatatgGAATTGGGATTTGGAGGAGG Nc0533R+B tcggatccTCTGAAGGGTCGGGTGAAG | pgex-MAP2-F cgggatccACAAAAACGGCCACCGAA pgex-MAP2-R cggaattcAGGGGTATGAGGGGCAGTAA |
| 100547 | Nc0547F+N gaccatATGTTTCTACACAGCCTTGGTG Nc0547R+B ctggatccGAAGTCATCTTTCGTGTAACATTTACTG | |
| 100566 (SWP30) | Nc0566F+N gtacatATGCGGGAATATGAACATCC Nc0566R+B caggatcCTTTAAACAACGTGTTCTTTCTGTAC | pgex-SWP30-F cgggatccTTTGGGATGCGGGAATA pgex-SWP30-R cggaattcAGCAGTTACACGATGATCCCA |
| 100587 | Ncer100587F+N atgcatatgGAAGGTATTCCGCCAACAAAC Ncer100587R+B atggatccGGAATGAAGCCTGATAGTTAGG | 100587 |
| 100768 (EnP1B) | NcORF803F+N ttgcatatgGAAGCGCAAGTCGAAAGTGC NcORF803R+B aacggatccATACCAGCAGGTCTGCAATC | |
| 100820 | Ncer100820F+N tggcatatgACAATCCACAAATCCGCCCATAG Ncer100820R+B atggatcCTTTTGGAATCTGATGCCCCAGC | |
| 100828 (HWP4) | Nc0865F+N cctcatatgCATGAACCTAAGGGATTAGCAAG Nc0865R+B caggatcCTCTTCGTGTGCATCATCCG | pgex-SWP4-F cgggatccCCAGTGTGTACACCATGCAAT pgex-SWP4-R cggaattcGGCTACACGTCCCATTCAC |
| 100918 | Ncer100918F+N ccgcatatgGAAGGATGGGAGAAATCGG Ncer100918R+B gtggatccATTTCATGGCTTGATCTCATTTG | pgex-BIR-F cgggatccTTTTCATACGAGCAAAGACTCAA pgex-BIR-R cggaattcTAGGCTAAGTTTGTATTCTTTGTG |
| 101049 | Nc1049F+N atccatatgCCCATTCTTTGTATACCGG Nc1049R+B caggatccGTGTGTTGCGCCTTTCTTAC | pgex-CHN-F cgggatccGTAAGAAAGGCGCAACACACA pgex-CHN-R cggaattcTGTCCTAAGTCTGGGCAGAAGA |
| 101095 | Ncer101095F+N ctgcatatgGCGTTTGTGCGATTAACTAACATTG Ncer101095R+B gtggatccTTTAAATCTCAAGATATCCCTTCG | |
| 101108 (HexoK) | Nc1108F caccatatgTATGATGTACCAGGTTACAC Nc1108R taggatccAGCTTGCTTTTACAAATCATCG | pgex-HK-F cgggatccGTGGGAGGTAGCTTTTTC pgex-HK-R cggaattcCGCGCCGATAAATGTTAGACC |
| 101165 | Nc1165F caacatatGCAACCAACTACACGGCCTG Nc1165R tgggatccTGTGCCTTCATCATCATCGTC | |
| 101296 | Ncer101296F+N ctgcatatgAGGGAGGCGACAAGTACAG Ncer101296R+B gtggatccATGTGAGTTGTCCGGAATAGC | pgex-pSb-F cgggatccGCAGTGGAGTCGATTGAGA pgex-pSb-R cggaattcACCTACGACACCTGGTTCTGA |
| 101349 | Nc1349F gagcatatgGCATCATGTGTGGGCAGAG Nc1349R tcggatccTTCTGATGAACAGGATCTCC | |
| 101590 (PTP2) | NcPTP2Bam cgggatccGTAGCCAAGTTGCCACCT NcPTP2Eco cggaattcGGGTCTTCATCCTTGTC | |
| 101591 (PTP1) | Nc1591F+N ggtcatatgGCAGGACAACAAGGAAGACCTG Nc1591R+B caggatcCGGTGGATTGTTTCCTTGAG | |
| 101600 | Nc1600F+N ggacatatGCCTATGACTTCATTACAAGAAGAATC Nc1600R+B caggatccTCACTCGTAAGTTTCGCATTTG | pgex-MAP3-F cgggatccGGAAGTAGCAAGCCAGTAAAGT pgex-MAP3-R cggaattcCTCGGTAAGCTCCTCTTCTGC |
| 102328 | Ncer102328F+N acacatatGCAGTACTCAACACGAATGG Ncer102328R+B gtggatccGTATACGATCACATCCAT | |

V.A. Matériel et Méthodes

V.A.1. Construction des plasmides recombinants

La stratégie utilisée pour construire les plasmides recombinants est présentée dans la **Figure 37**.

V.A.1.1. Insertion en vecteurs de clonage

Un extrait d'ADN de *N. ceranae* a été obtenu comme précédemment à partir d'une abeille provenant du rucher du laboratoire (**Cf. IV.A.1.**). Les réactions de PCR ont été réalisées avec 1 Unité de GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega), en utilisant une température d'hybridation de 52°C et les amorces listées dans le **Tableau 8**. Une autre unité de polymérase a, ici aussi, été ajoutée avant l'élongation finale pour optimiser les ligatures (**Cf. IV.A.4.**). L'ADN a ensuite été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop-ND1000 (ThermoScientific).

Les produits d'amplifications ont été insérés dans des vecteurs de clonage pCRII-TOPO (TOPO[®] TA Cloning[®] Kit, Dual Promoter, Invitrogen) ou pGEM-T (pGEM[®]-T Easy Vector Systems, Promega), en suivant les instructions des fournisseurs. Après transformation dans des cellules *E. coli* DH5 α , culture et purification des plasmides (**Cf. IV.A.4.**), certains d'entre eux ont été séquencés (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne) bi-directionnellement en utilisant les amorces M13rev(-29) et T7 des fournisseurs.

V.A.1.2. Construction de vecteurs d'expression

Afin de produire des protéines portant une étiquette histidine, deux vecteurs d'expression ont été utilisés: le vecteur pET-15b (Novagen) et le vecteur pGEX-4T1His, qui correspond au plasmide pGEX-4T1 (GE Healthcare) auquel une séquence codant une étiquette de 6 résidus histidine a été ajoutée en début de cadre de lecture (**Figures 38 et 39**). Les inserts des vecteurs de clonage ont été excisés par digestion à l'aide d'enzymes de restriction en fonction des sites insérés à l'extrémité 5' des amorces: *Nde*I et *Bam*HI pour le clonage en pET-15b, et *Bam*HI et *Eco*RI pour le clonage en pGEX-4T1His (**Tableau 8**). Dans certains cas, les produits de PCR ont directement été digérés après purification. Les réactions ont été réalisées pendant 2 h à 37°C dans le tampon NEB4, avec 1 unité de chaque enzyme et au maximum 1 μ g de matériel génétique, dans un volume final de 20 μ l. 15 μ L de mélange réactionnel ont ensuite été prélevés pour une précipitation alcoolique, les 5 μ L restants ayant été déposés sur gel d'agarose pour vérifier la digestion (avec un contrôle positif de digestion réalisé en utilisant un plasmide déjà doté d'un insert).

Une ligature a ensuite été réalisée à 16°C sur la nuit dans un volume final de 10 µL en utilisant 3 unités de T4 DNA ligase (Promega), 100 ng de vecteur, et un ratio de vecteur par insert de 1:2 et 1:5 pour les clonages dans le pET-15b et le pGEX-4T1His respectivement. Après transformation, les plasmides ont été préparés comme précédemment (**Cf. IV.A.4**). Afin de vérifier les constructions plasmidiques, la région codant la protéine de fusion espérée a été séquencée (Eurofins MWG Operon) en utilisant les amorces T7 et T7term pour les clonages en pET-15b et les amorces pGexfor et pGexrev pour les clonages en pGEX-4T1His.

V.A.2. Production de protéines recombinantes

V.A.2.1. Production de protéines recombinantes chez *Escherichia coli*

Les vecteurs pET-15b et pGEX-4T1His permettent, en présence d'IPTG, la production de protéines de fusion portant notamment une étiquette histidine (**Figures 38 et 39**). Les plasmides ont été transformés dans différentes souches bactériennes (**Cf. Annexes**). 50 mL de milieu LB additionné d'ampicilline ont étéensemencés et cultivés à 30 ou 37°C jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ entre 0.5 et 0.7. La production des protéines recombinantes a été induite par ajout d'IPTG à 1 mM final. Des échantillons ont été prélevés à différents temps.

V.A.2.2. Séparation des protéines par SDS-PAGE

Les échantillons additionnés de tampon de dépôt contenant du β-mercaptoéthanol ont été portés à ébullition pendant 15 min et les protéines ont été séparées sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes à ampérage constant de 25mA/gel (BioRad Mini-Protean II Instruction Manual). Après migration, les protéines ont été révélées grâce à une solution alcoolique au bleu de Coomassie.

V.A.2.3. Purification de protéines portant une étiquette histidine

Les cellules prélevées après induction de l'expression ont été culottées (10 min à 7 000 rpm) et resuspendues dans DO₆₀₀/10 µL de tampon de fixation BB (0.3 M NaCl, 5 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl pH 8) puis lysées pendant 2 h à 37°C en présence de lysozyme à 0.2 mg/mL et d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitor Cocktail, PIC, Sigma-Aldrich). Les débris cellulaires ont été éliminés par deux centrifugations successives de 10 min à 12 000 rpm à 4°C.

Les purifications de protéines recombinantes portant une étiquette histidine (His•Tag) ont été réalisées par chromatographie à chélation du métal en utilisant le kit His.Bind[®] de

NOVAGEN. Après fixation des protéines dans le tampon BB, plusieurs lavages ont été réalisés en augmentant la concentration d'imidazole à 20 mM. Des éluats ont ensuite été récupérés après augmentation de la concentration d'imidazole à 100, 200, 500 et 1 000 mM et les protéines qu'ils contiennent ont été séparées par SDS-PAGE.

V.A.3. Production d'anticorps et immunodétection de protéines

V.A.3.1. Production d'anticorps

Pour une injection directe de protéines extraites d'un gel SDS-PAGE dans des souris, un gel préparatif d'1 mm d'épaisseur a été préparé. Après migration et révélation, la bande souhaitée a été excisée puis broyée à l'aide d'un Potter dans du PBS. Après 3 jours d'incubation à 4°C, la solution a été séparée des fragments de gels et conservée à -20°C. Des anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines recombinantes ont été obtenus chez des souris BALB/c après injection d'extraits protéiques à l'animalerie de l'Université Blaise Pascal. Toutes les semaines, les souris ont reçu par injection intra-péritonéale 150 µL d'échantillon protéique homogénéisé avec de l'adjuvant de Freud (Sigma), incomplet lors de la première injection et complet lors des injections suivantes. Au total, cinq injections par souris ont été réalisées. Le sang a été collecté une semaine après la dernière injection (au bout de 6 semaines) et centrifugé pour récupérer environ 500 µL de sérum.

Devant les échecs de clonage et d'expression, un peptide correspondant au motif répété de la protéine NCER_101600 a été dessiné pour sa synthèse et la production d'anticorps polyclonaux (Eurogentec, Seraing, Belgique). Le sérum est encore en attente au moment de la rédaction de ce document.

V.A.3.2. Immunodétection par WesternBlot

Afin de vérifier la spécificité des anticorps, les protéines extraites d'abdomens broyés d'une abeille saine et d'une abeille infectée (l'absence ou la présence de *N. ceranae* ayant été vérifiée par PCR), ainsi que de spores purifiées ont été séparées par SDS-PAGE comme indiqué précédemment. Les protéines ont ensuite été transférées sur des membranes de polyfluorure de vinylidène (PVDF, Millipore). Après saturation avec une solution de PBS contenant 5% de lait en poudre, les membranes ont été incubées pendant 1 h en présence d'antisérum dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS, 0.1% Triton X-100. Après lavages, une incubation d'1 h a été réalisée en présence d'anticorps secondaires couplé à la phosphatase alcaline (anti-IgG de souris, Promega) dilués au 1/10000^{ème}. La révélation de l'activité

phosphatase alcaline a été réalisée par coloration après ajout des substrats NBT/BCIP (Promega).

V.A.3.3. Détection par immunofluorescence

Des intestins moyens (ventricules) d'abeilles expérimentalement infectées par *N. ceranae* ont été fixés au formaldéhyde 4% (v/v) dans du PBS, déshydratés à l'alcool puis enrobés en paraffine. Des coupes de 8 µm d'épaisseur ont été réalisées, déposées sur lames de verre, déparaffinées pendant 20 min en présence de toluène puis progressivement réhydratées dans des bains d'alcool de degré décroissant. Après lavages au PBS et saturation pendant 15 min en présence de BSA (albumine de sérum bovin) 3% (w/v), les coupes ont été traitées sur la nuit en présence d'anticorps primaires (sérum de souris) dilués au 1/250^{ème} dans du PBS, BSA 0,3%, lavés plusieurs fois en PBS puis traitées par l'anticorps secondaire (anti-IgG de souris couplé au fluorochrome FITC) dilué au 1/500^{ème} dans du PBS, BSA 0,3%, Tween-20 0.2 %. Après plusieurs lavages en PBS, Tween-20 0,2% les lames ont été observées sous un microscope à épifluorescence (Leica DMR 50) équipé d'un système d'acquisition d'images (Leica Q-FISH). Une contre-coloration du matériel nucléaire a été effectuée pour chaque coupe par ajout de DAPI (1 µg/ml) au milieu de montage (Citifluor AF1-Biovalley) juste avant observation des lames.

Tableau 9 : Gènes sélectionnés pour leur clonage. La présence d'un peptide signal potentielle a été évaluée avec la version V4.0 plus stringente du logiciel SignalP (Petersen *et al.*, 2011).

| Locus (NCER_) | Prédiction d'un peptide signal (D-score) | Homologue annoté chez une microsporidie [Domaine] |
|------------------|---|--|
| 100064 (SWP25) | OUI (0.628) | SWP25 (<i>N. bombycis</i>) [-] |
| 100070 | OUI (0.645) | - [Motif répété] |
| 100083 (PTP3) | OUI (0.558) | PTP3 (<i>N. bombycis</i> , <i>E. cuniculi</i>) [-] |
| 100290 | OUI (0.675) | HSWP7 putative (<i>N. bombycis</i>) [-] |
| 100295 (SWP26) | OUI (0.597) | SWP26 (<i>N. bombycis</i>) [-] |
| 100533 | OUI (0.635) | - [Motif répété] |
| 100547 | OUI (0.675) | transporteur UDP-N-acétylglucosamine (<i>N. bombycis</i>) [Triose-phosphate Transporter] |
| 100566 (SWP30) | OUI (0.462) | SWP30 (<i>N. bombycis</i>) [-] |
| 100587 | NON (0.102) | protéine kinase cyclin-dépendente putative (<i>E. intestinalis</i>) [Ser/Thr protéine kinase cyclin-dépendente] |
| 100768 (EnP1B) | OUI (0.691) | EnP1 (<i>E. cuniculi</i>) [Motif répété] |
| 100820 | NON (0.098) | cycline 1 putative (<i>E. intestinalis</i>) [Cycline] |
| 100828 (HSWP4) | OUI (0.643) | HSWP4 putative (<i>N. bombycis</i>) [-] |
| 100918 | NON (0.106) | - [Inhibiteur d'apoptose (BIR, baculoviral)] |
| 101049 | NON (0.180) | - [Canal ionique mécanosensible] |
| 101095 | NON (0.212) | SWP25, faible homologie (<i>N. bombycis</i>) [-] |
| 101108 (HexoK) | OUI (0.587) | Hexokinase (<i>E. intestinalis</i>) [Hexokinase] |
| 101165 | OUI (0.668) | - [DNA translocase, signal nucléaire] |
| 101296 | NON (0.439) | HSWP7 putative (<i>N. bombycis</i>) [-] |
| 101349 | NON (0.434) | - [Domaine extracellulaire SCP-like] |
| 101590 (PTP2) | OUI (0.681) | PTP2 (<i>N. bombycis</i> , <i>E. cuniculi</i>) [-] |
| 101591 (PTP1) | OUI (0.716) | PTP1 (<i>N. bombycis</i> , <i>E. cuniculi</i>) [-] |
| 101600 | OUI (0.602) | - [Motif répété] |
| 102328 | OUI (0.851) | SWP putative (<i>E. cuniculi</i>) [-] |

V.B. Résultats / Discussion

V.B.1. Recherche de gènes potentiellement impliqués dans la pathogénie de *N. ceranae*

Chez *N. ceranae*, aucune étude publiée n'a pour le moment clairement identifié et localisé des protéines des stades extracellulaires ou intracellulaires du parasite. Des gènes potentiellement impliqués dans la pathogénie de *N. ceranae* ont été recherchés dans le génome, en se basant soit sur des homologues avec des protéines connues chez d'autres microsporidies, soit sur l'existence de domaines d'intérêt.

V.B.1.1. Gènes structuraux de la spore

Dans un premier temps, des gènes ont été choisis parce qu'ils codent des protéines dont les homologues sont connus pour être des éléments structuraux de la spore ou du tube polaire chez d'autres espèces microsporidiennes. De telles protéines sont donc supposées spécifiques aux stades de sporontes, sporoblastes ou spores.

Les gènes NCER_100064, NCER_100295 et NCER_100566 codent des protéines dont les homologues SWP25, SWP26 et SWP30 ont été caractérisés chez *N. bombycis*. Ils ont ainsi été nommés de la même façon (**Cf II.C.2**). Le gène NCER_100768 (EnP1B) code une protéine homologue à EnP1 d'*E. cuniculi* et les gènes NCER_100828 (HSWP4), NCER_100290, NCER_101095, et NCER_101296 codent pour des homologues à des SWP putatives de *N. bombycis*, dont ni le rôle ni la localisation n'ont été démontrés (**Tableau 9**). Il en est de même pour le gène NCER_102328, homologue à une SWP potentielle et non caractérisée d'*E. cuniculi*. L'intérêt était ici de caractériser de potentielles nouvelles SWP. De plus, certaines d'entre elles pouvant être présentes à la surface de la spore, elles pourraient être impliquées dans une éventuelle reconnaissance tissulaire.

Les protéines de tube polaire sont impliquées dans le processus d'invasion (**Cf. II.C.3.3.**). Trois gènes ont été sélectionnés, codant les protéines du tube polaire PTP1, PTP2 et PTP3, homologues à celles décrites chez *N. bombycis* et *E. cuniculi*.

V.B.1.2. Gènes codant des protéines portant des domaines d'intérêts

D'autres gènes ont été choisis selon les domaines protéiques qu'ils codent (**Tableau 9**). Un intérêt particulier a été porté sur les protéines portant un signal de sécrétion potentiel, donc probablement adressées vers des compartiments non cytoplasmiques, notamment le milieu extracellulaire. Les protéines déjà décrites (**Cf. IV.B.1.**) et codées par NCER_100070,

NCER_101165, NCER_100533 et NCER_101600 portent un peptide N-terminal ayant une forte probabilité de constituer un peptide signal. Trois d'entre elles portent en outre des domaines répétés. NCER_101165 porte, elle, un domaine de type DNA translocase et un potentiel signal d'adressage vers le noyau.

NCER_100547 code également une protéine portant un peptide signal potentiel. Cette protéine appartient à une famille de transporteurs de triose-phosphates, molécules impliquées dans la glycolyse. NCER_101108 (HexoK) code pour une hexokinase, protéine ubiquitaire fortement conservée et impliquée dans la première étape de la glycolyse. Chez les microsporidies, les hexokinases semblent avoir acquis un peptide signal de sécrétion et seraient exportées dans la cellule hôte (Cuomo *et al.*, 2012). Ces deux gènes seraient présents chez les autres microsporidies et pourraient être liés aux capacités des parasites à utiliser les ressources énergétiques de leur hôte.

La protéine codée par NCER_101349, elle aussi potentiellement exportée, comprend un domaine extracellulaire SCP. Ce domaine est toujours porté par des protéines sécrétées, qui sont impliquées dans de nombreuses fonctions, certaines étant liées au développement et à la pathogénie (Yeats *et al.*, 2003).

NCER_101049 appartient à une famille de gènes codant des canaux mécanosensibles à faible conductance, dont les membres sont connus pour réguler la pression osmotique entre deux compartiments cellulaires. Il pourrait par exemple avoir un rôle dans le processus de dévagination du tube polaire, bien qu'aucun élément n'appuie pour l'instant cette hypothèse.

La protéine codée par NCER_100918 porte un domaine appelé BIR (Inhibitor of Apoptosis) initialement décrit chez des baculovirus, où il est impliqué dans des processus anti-apoptotiques. Chez les levures, ces domaines sont impliqués dans la régulation de la cytokinèse (Verhagen *et al.*, 2001). Cette protéine a été ciblée car il a été suggéré qu'une régulation de l'apoptose pourrait avoir lieu chez un hôte infecté par *N. ceranae* (Higès *et al.*, 2013).

Les protéines codées par NCER_100820 et NCER_100587 contiennent des domaines qui correspondent, pour le premier à une cycline, et pour le second, à une kinase cycline-dépendante. Elles pourraient être impliquées dans la régulation du cycle du parasite, ou de l'hôte.

Tableau 10: Résultats des clonages. Pour chaque gène sont indiqués les plasmides dans lequel un fragment d'ORF a été cloné. Les astérisques indiquent les clonages vérifiés par séquençage.

| ORF | Taille de l'insert (pb) | Vecteur de clonage | Vecteur d'expression |
|---------------------|-------------------------|---------------------|----------------------|
| NCER_100064 (SWP25) | 716 | pCRII-TOPO* | pET-15b* |
| NCER_100070 | 748 | pCRII-TOPO*, pGEM-T | pET-15b |
| NCER_100083 (PTP3) | 689 | - | - |
| NCER_100290 | 578 | pCRII-TOPO | - |
| NCER_100295 (SWP26) | 294 | pGEM-T* | pGEX4T1-His |
| NCER_100533 | 727 | pCRII-TOPO* | - |
| NCER_100547 | 691 | pCRII-TOPO* | - |
| NCER_100566 (SWP30) | 595 | pGEM-T* | pET-15b |
| NCER_100587 | 627 | pCRII-TOPO | - |
| NCER_100768 (EnP1B) | 802 | pCRII-TOPO* | - |
| NCER_100820 | 532 | pCRII-TOPO, pGEM-T | - |
| NCER_100828 (HSWP4) | 709 | pCRII-TOPO*, pGEM-T | pET-15b |
| NCER_100918 | 446 | pCRII-TOPO* | - |
| NCER_101049 | 694 | pCRII-TOPO* | pET-15b |
| NCER_101095 | 428 | pCRII-TOPO | - |
| NCER_101108 (HexoK) | 1100 | pCRII-TOPO*, pGEM-T | - |
| NCER_101165 | 647 | pCRII-TOPO*, pGEM-T | pET-15b* |
| NCER_101296 | 809 | pCRII-TOPO | - |
| NCER_101349 | 1460 | pCRII-TOPO* | pET-15b* |
| NCER_101590 (PTP2) | 510 | pGEM-T | pGEX4T1-His* |
| NCER_101591 (PTP1) | 685 | pCRII-TOPO | - |
| NCER_101600 | 967 | pCRII-TOPO* | - |
| NCER_102328 | 567 | - | - |

Tableau 11 : Expression de gènes recombinants chez *Escherichia coli*. Les génotypes des souches utilisées sont indiqués en annexe.

| Protéine recombinante (plasmide) | Souche | Température d'incubation | Expression |
|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------|
| SWP25 (pET-swp25) | BL21 (DE3) | 20°C, 37°C | - |
| | BL21 Star (DE3) | 37°C | - |
| | BLR (DE3) | 37°C | ++ |
| | Rosetta-gami 2 (DE3) + pLysSRARE2 | 20°C, 37°C | - |
| NCER_100070 (pET-map4) | BL21 (DE3) | 20°C, 37°C | - |
| | Rosetta 2 (DE3) + pLysSRARE2 | 20°C, 37°C | - |
| SWP30 (pET-swp30) | BL21 (DE3) | 20°C, 37°C | - |
| | Rosetta-gami 2 (DE3) + pLysSRARE2 | 20°C, 37°C | - |
| HSWP4 (pET-swp4) | BL21 (DE3) | 37°C, 20°C | - |
| | Origami B (DE3) | 37°C | - |
| | Rosetta-gami 2 (DE3) + pLysSRARE2 | 37°C, 20°C | - |
| | | | |
| NCER_101049 (pET-chn) | BL21 (DE3) | 37°C, 20°C | - |
| | Rosetta-Gami (DE3) | 37°C, 20°C | - |
| NCER_101165 (pET-dbp) | BL21 (DE3) | 20°C, 37°C | - |
| | BL21 (DE3) | 30°C | + |
| | BL21 star (DE3) | 37°C | - |
| | BL21 star (DE3) | 30°C | +++ |
| | BRL (DE3) | 37°C | ++ |
| | Origami B (DE3) | 37°C | + |
| | Novablue (DE3) | 37°C | - |
| | Rosetta-gami 2 (DE3) + pLysSRARE2 | 37°C | +++ |
| | Rosetta-gami 2 (DE3) + pLysSRARE2 | 20°C | - |
| | | | |
| NCER_101349 (pET-prp) | BL21 (DE3) | 37°C, 20°C | - |
| | BLR (DE3) | 37°C | + |
| | Rosetta-gami 2 (DE3) + pLysSRARE2 | 37°C, 20°C | - |
| PTP2 (pGEX-ptp2) | BL21 star | 37°C | + |

V.B.2. Clonages

Les clonages en vecteurs pGEM-T ou pCRII-TOPO ont pour la plupart fonctionné (**Tableau 10**). Le séquençage des fragments insérés a montré une variation de séquence par rapport aux séquences du génome de *N. ceranae*, ce qui était attendu aux vues des résultats précédents concernant la diversité nucléotidique des gènes codants. Seuls ceux dont le cadre de lecture n'était pas modifié par un *indel* ou une substitution non sens ont été conservés.

Les clonages en vecteurs d'expression ont en revanche posé plus de problèmes. Les digestions par les enzymes de restriction ont toutes été satisfaisantes, les bandes attendues apparaissant après électrophorèse. Les difficultés sont donc venues des étapes ultérieures de clonages. Les contrôles de transformations étant positifs, il a été suggéré, bien que tardivement, que l'étape de préparation de la ligature était probablement limitante. Si la ligature en elle-même peut difficilement être mise en doute (les réactifs ont été renouvelés à plusieurs reprises), la purification des fragments digérés d'ADN après excision de gels d'agarose s'est avérée peu efficace, avec des pertes conséquentes de matériel. Une hypothèse expliquant ce phénomène pourrait provenir du fort pourcentage de nucléotides A et T, qui atteint 74% dans le génome de *N. ceranae* (Cornman *et al.*, 2009). Ceci induirait une hybridation plus faible entre deux brins d'ADN et l'utilisation d'une température de 70°C pour faire fondre le gel d'agarose pourrait alors modifier la structure des appariements et gêner leur ligature. Des essais rapides ont été réalisés très récemment en diminuant la température à 37°C, mais ils ne se sont pas montrés concluants à ce jour.

V.B.3. Production de protéines de fusion

Les constructions permettant l'expression de huit protéines recombinantes ont été utilisées, en combinaison avec plusieurs souches d'*E. coli* et en testant plusieurs températures de culture (**Tableau 11**). Des prélèvements ont été effectués après différents temps d'incubation et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. Aucune production de protéines de fusions portant des portions de HSWP4, SWP30, NCER_100070 et NCER_101049 n'a été observée. Les constructions portant PTP2 et NCER_101349 ont permis une expression mais trop faible pour permettre une production suffisante de protéines recombinantes. Seules les fusions portant SWP25 et NCER_101165 ont été convenablement exprimées, mais dans certaines conditions génotypiques et de température seulement. Sur les quatre souches testées, SWP25 n'a été produite que dans la souche BLR (DE3) cultivée à 37°C. NCER_101165 a été surexprimée dans la souche BL21 star (DE3) cultivée à 30°C mais pas à 37°C (**Figure 40**) et

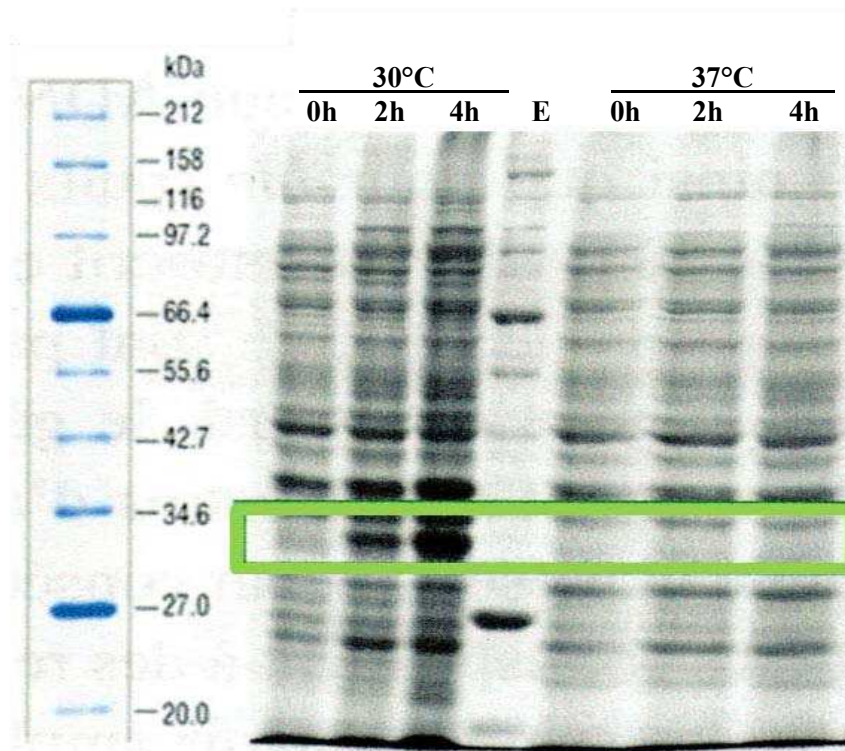


Figure 40 : Expression de la protéine de fusion His•Tag-NCER₁₀₁₁₆₅ dans la souche d'*E. coli* BL21 star (DE3), cultivée et maintenue à 30°C ou à 37°C. Des prélèvements ont été effectués 2 h et 4 h après induction à l'IPTG (0 h) et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. La taille attendue de la protéine est de 27.3 kDa. E: échelle de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, valeurs en kDa)

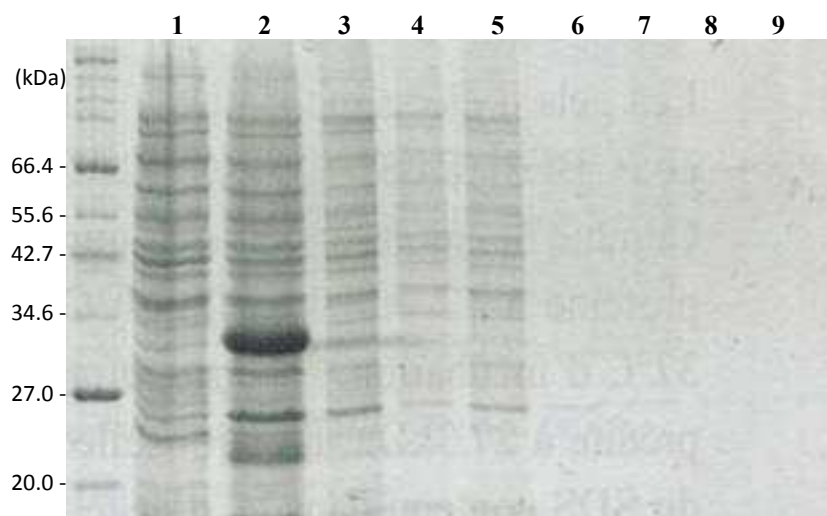


Figure 41: Purification de la protéine de fusion His•Tag-NCER₁₀₁₁₆₅ par chromatographie d'affinité. 1. Extrait cellulaire total au moment de l'induction à l'IPTG. 2. Extrait cellulaire 4 h après induction. 3. Extrait (surnageant) de protéines total déposé sur résine. 4. Eluat de charge après dépôt. 5. Eluat de lavages. 6-9. Eluats en présence de 100, 200, 500 et 1 000 mM d'imidazole. Il s'est avéré que la protéine recombinante était absente de l'extrait déposé (3^{ème} puit)

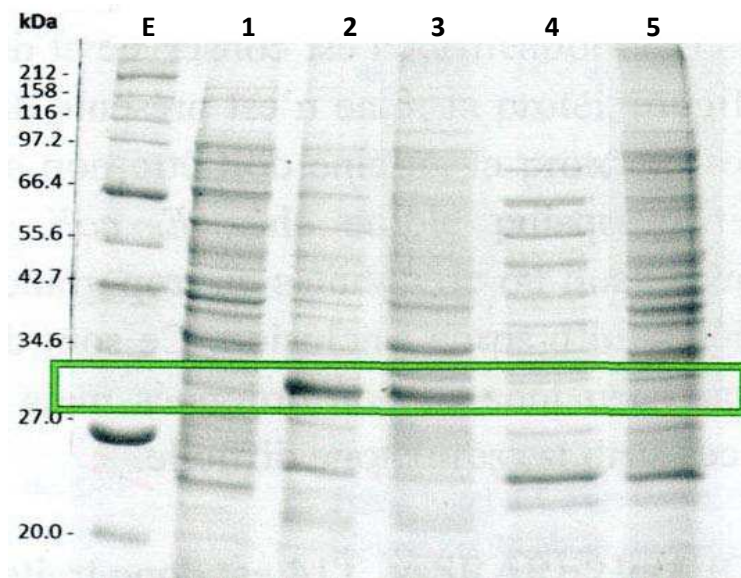


Figure 42 : Essais de solubilisation de la protéine de fusion NCER_101165. 1. Extrait cellulaire total au moment de l'induction à l'IPTG. 2. Extrait cellulaire après induction. 3. Resuspension du culot après lyse au lysozyme. 4. Surnageant après traitement avec 6 M d'urée. 5. Surnageant après traitement avec 0.5% de N-Lauroylsarcosine.

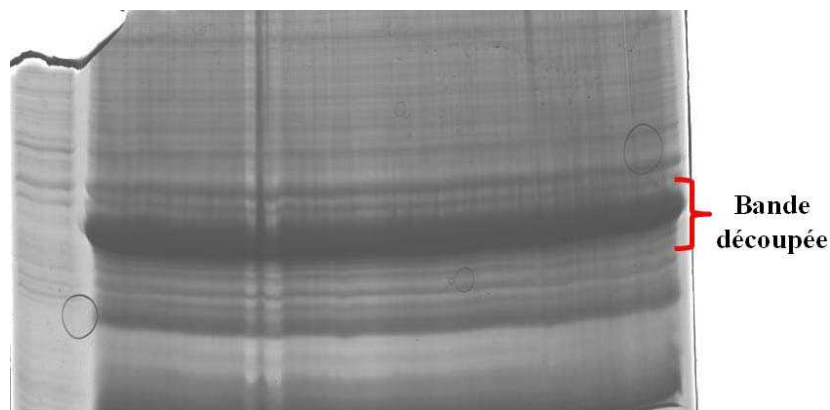


Figure 43: Gel préparatif de séparation du culot contenant la protéine de fusion NCER_101165. Les protéines du témoin d'induction (avant ajout d'IPTG, à gauche) et de l'échantillon induit (puit unique sur le reste du gel) ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel préparatif. La bande correspondant à la protéine de fusion apparaît très nettement et a été excisée.

dans la souche Rosetta-gami 2 (DE3) porteuse du plasmide pLysSRARE2 (qui permet l'expression de gène portant des codons rares chez *E. coli*) cultivée à 30°C mais pas à 20°C.

Les échantillons issus d'une même souche et riches en protéines recombinantes SWP25 ou NCER_101165 ont été rassemblés. Après lyse des cellules en présence de lysozyme et précipitation des débris, les surnageants ont été utilisés pour réaliser des purifications par chromatographie d'affinité et chaque éluat obtenu à l'issue de la purification a été déposé sur un gel SDS-PAGE. Pour les deux protéines recombinantes, aucune protéine n'a été retrouvée dans les éluats car aucune n'était en fait présente dans l'extrait déposé sur la colonne (**Figure 41**). Dans la préparation de l'échantillon, la centrifugation réalisée pour précipiter les débris cellulaires a également induite celle des deux protéines recombinantes. Il arrive que les protéines produites en grande quantité et mal repliées s'agrègent en corps d'inclusion dont la solubilisation est très difficile. Les protéines produites ici sont non seulement hétérologues pour *E. coli*, produites en grande quantité mais aussi incomplètes, ce qui peut gêner leur repliement. Le culot issu de l'expression de SWP25 ayant été malheureusement éliminé, une solubilisation des protéines de celui contenant NCER_101165, qui avait été conservé, a été tentée. Après resuspension du culot du tampon BB, des fractions ont été traitées en présence de 6 M d'urée ou de 0.5% de N-Lauroylsarcosine, un surfactant ionique, les deux traitements étant compatibles avec la résine utilisée pour la purification. Après centrifugation, les surnageants ont été déposés sur gel SDS-PAGE, montrant qu'aucun des deux traitements n'a permis de solubiliser la protéine (**Figure 42**).

N'ayant pas réussi à purifier la protéine de fusion NCER_101165, il a été décidé d'injecter à une souris la protéine directement excisée d'un gel SDS-PAGE. Le culot contenant la protéine a été déposé sur un gel préparatif et la bande correspondant à NCER_101165 a été découpée (**Figure 43**). Cette technique a l'avantage d'être plus rapide et de comporter plus de molécules antigéniques qui vont accroître la réponse immunitaire des animaux recevant les injections. En revanche, la protéine recombinante ne sera pas la seule injectée.

V.B.4. Production d'anticorps

La fraction séparée du broyat de gel contenant la protéine de fusion NCER_101165 a été injectée à deux souris. La spécificité du sérum polyclonal obtenu a ensuite été testée par Western Blot sur des extraits protéiques provenant d'une abeille saine, d'une abeille infectée par *N. ceranae* et de spores purifiées du parasite. L'antisérum permet la détection de deux bandes protéiques spécifiques à *N. ceranae*, puisqu'elles sont absentes d'une abeille non

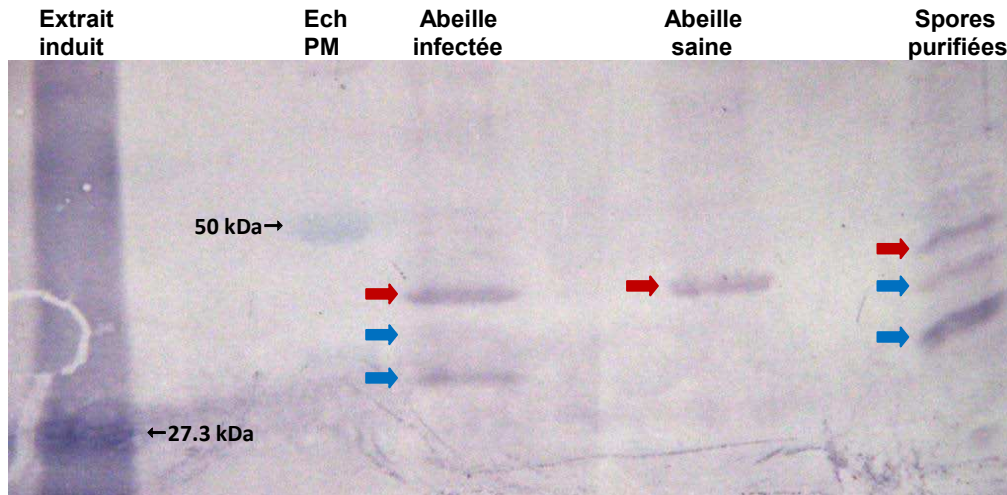


Figure 44: Immunodétection des protéines reconnues par l'antisérum anti- NCER_101165. L'extrait protéique après induction à l'IPTG a servi de témoin positif, où apparaît la bande injectée à 27.3 kDa. L'échelle moléculaire (Ech PM), peu visible, montre le marqueur à 50 kDa. L'antisérum fait apparaître deux bandes spécifiques à *N. ceranae* (flèches bleues) mais reconnaît aussi une protéine présente chez l'abeille saine et dans la préparation de spores de *N. ceranae* (flèches rouges).

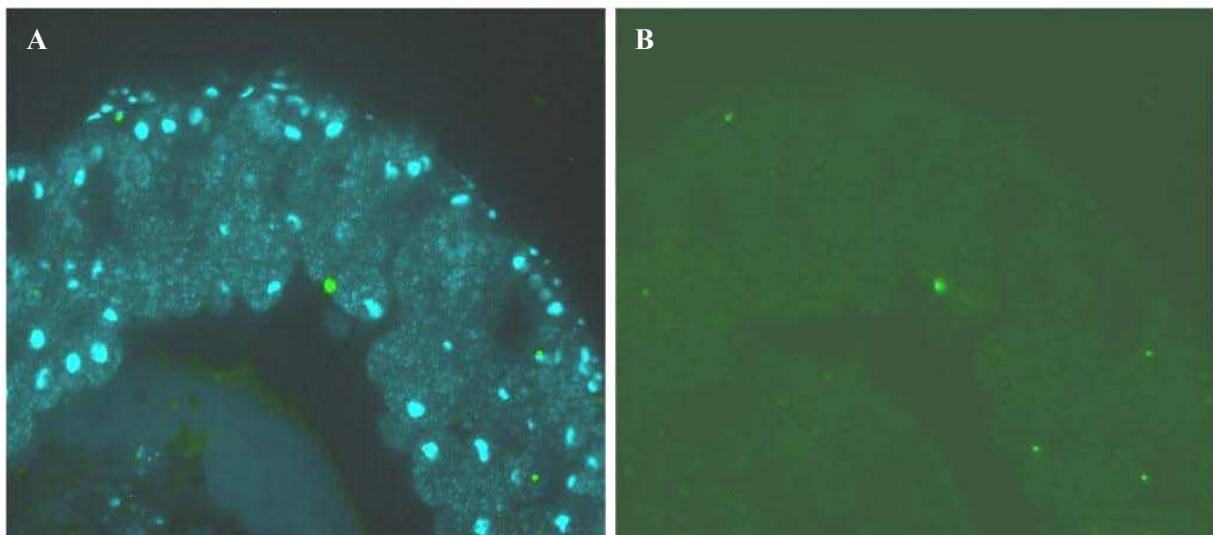


Figure 45: Immunolocalisation de la protéine NCER_101165 dans des intestins d'abeilles infectées par *N. ceranae*. A. Détection des noyaux cellulaires au DAPI. Les noyaux parasites se distinguent facilement des noyaux des cellules hôtes par leur petite taille. A et B. Détection des anticorps de l'antisérum par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps secondaire couplé au FITC. Les points verts lumineux sont des artefacts.

infectée (**Figure 44**). La taille attendue de la protéine NCER_101600 étant de 49.5 kDa, l'observation de bandes correspondant à des tailles plus basses pourrait indiquer une dégradation de la protéine native. Les anticorps reconnaissent aussi une protéine présente chez l'abeille saine et dans l'échantillon de spore purifiée. Il pourrait s'agir là de la reconnaissance d'une protéine de l'hôte ou de sa flore intestinale. Les spores ont en effet été préparées à partir d'un broyat d'abdomens d'abeilles infectées.

L'antisérum a été utilisé pour observer par immunofluorescence où les anticorps se fixent sur des coupes d'intestins d'abeilles expérimentalement infectées par *N. ceranae* (**Figure 45**). Aucun signal spécifique de fluorescence (hors bruit de fond) n'a été détecté, que cela soit au niveau des parasites ou de l'hôte. Ce phénomène pourrait être lié à l'éventuelle dégradation de la protéine NCER_101600. Il semble donc que cet antisérum ne soit malheureusement pas exploitable en immunofluorescence. Un deuxième sérum, issu d'une autre souris, n'a pas encore été testé à ce jour car il n'a toujours pas été récolté.

Finalement, un peptide portant le motif répété de NCER_101600 (N-CESKPETSSKLFGGS.C) a été dessiné pour sa synthèse et la production d'un anticorps. Un retard important du fournisseur fait qu'à ce jour, nous sommes malheureusement toujours en attente de l'anticorps.

V.C. Conclusion

Sachant que le rendements de clonage sont parfois faibles, de nombreuses protéines ont été ciblées au départ pour s'assurer de finaliser ce projet avec un nombre restreint de protéines. En effet, seulement 8 vecteurs d'expressions ont pu être construits et tous n'ont pas permis la production de protéines recombinantes. Quatre ont été produites, mais 2 en quantité insuffisante pour produire des anticorps. Quand à SWP25, la protéine a été éliminée au cours de l'expérimentation. Enfin, les anticorps produits contre NCER_101600 n'ont pas permis de détecter la protéine par immunofluorescence sur des coupes d'intestins infectés.

Ce qui a le plus entravé la finalisation de ces expérimentations est le manque de temps. En effet, outre les difficultés de clonage, la production d'anticorps par les souris prend au moins 6 semaines, sans compter le temps qu'il faut pour trouver les conditions optimales (souche bactérienne, température) pour produire les protéines recombinantes en quantité suffisante. Néanmoins, plusieurs expérimentations peuvent rapidement être menées pour finaliser le travail sur les quatre protéines produites chez *E. coli*, les vecteurs d'expression étant toujours disponible pour relancer une induction. SWP25 peut être produite et déposée sur gel préparatif sans élimination de la fraction insoluble, comme cela a été fait pour NCER_101600. En effet, SWP25 a aussi été éliminée à cause de sa précipitation, probablement sous forme de corps d'inclusion. La production des protéines de fusion dotées des séquences de PTP2 et NCER_101349 peut aussi être rapidement réalisée, maintenant que des conditions de cultures efficaces sont connues. Il suffira simplement d'augmenter l'échelle de la culture et donc la quantité de bactéries. Ainsi, des injections de ces trois protéines pourraient rapidement être effectuées. Concernant l'antisérum dirigé contre NCER_101600, il serait intéressant de vérifier par spectrométrie de masse si les deux bandes observées par Western-Blot (**Figure 9**) correspondent à NCER_101600, afin de savoir s'il s'agit bien de polypeptides issus de sa dégradation. L'antisérum récupéré de la deuxième souris ayant subi des injections devra aussi être testé, en espérant qu'il permettra d'obtenir un signal en immunocytochimie.

Afin d'optimiser l'ensemble de l'approche, il est possible de synthétiser des peptides pour la production d'anticorps, comme cela a été fait pour la protéine NCER_101600. Cette approche comporte cependant une plus grande part de risque car les peptides choisis peuvent s'avérer faiblement antigéniques.

CONCLUSION GÉNÉRALE

*« Croire ou ne pas croire,
cela n'a aucune importance.
Ce qui est intéressant,
c'est de se poser de plus en plus de questions. »*

-- Bernard Werber, L'Empire des Anges --

VI- Conclusion générale

La présence de *N. ceranae* dans des colonies atteintes de nosémosse et subissant un effondrement de population aussi bien que dans des colonies asymptomatiques montre que cette espèce présente une virulence variable. Si l'on considère la virulence comme un trait phénotypique, une telle variabilité reflèterait un polymorphisme du parasite (la présence ou non de certains déterminants génétiques) et/ou son polyphénisme (l'expression alternative de gènes en fonction des conditions environnementales) (Pfennig, 2001; Schwander and Leimar, 2011). Une variation du polymorphisme au sens strict implique une variation du patrimoine génétique du parasite selon les souches (d'où l'intérêt de caractériser des facteurs de virulence). Cependant, ne disposant pas de souches clonales parasitaires, et donc de données génomiques issues de ces différentes souches, notre travail s'est axé sur l'évaluation du polymorphisme au sens large, c'est-à-dire la variabilité nucléotidique de séquences génétiques chez *N. ceranae*.

Ce travail a montré qu'une population similaire de parasites infectait des abeilles géographiquement éloignées, suggérant que les variations de virulence ne seraient pas dues au polymorphisme génétique du parasite. Cette hypothèse mériterait toutefois d'être vérifiée en comparant les populations parasitaires présentes chez des abeilles saines et des abeilles atteintes de nosémosse. Il est cependant difficile de détecter la nosémosse, dont la symptomatologie n'est ni clairement détaillée ni évidente. En effet, la nosémosse de type C, due à *N. ceranae*, est distinguée de la nosémosse de type A (due à *N. apis*) par son agent étiologique et non par sa pathologie. Les isolats utilisés dans le cadre d'études d'effondrement de colonies en Espagne (Higes *et al.*, 2008) pourraient être des échantillons intéressants. Toutefois, nos résultats suggèrent qu'il est difficile, ou impossible, de différencier des isolats, ceux-ci étant peu divergents car possiblement issus d'une même population en expansion. Si les mêmes populations sont effectivement présentes dans le monde (ce qui reste évidemment à confirmer), il est fort probable que ce soit aussi le cas de l'isolat utilisé lors des études en Espagne. Ainsi, les variations de la virulence de *N. ceranae* ne seraient pas dues au fond génétique du parasite.

Si tel est le cas, cette variation pourrait alors être liée au polyphénisme, c'est-à-dire que la virulence dépendrait d'une modulation de l'expression de certaines fonctions pathogènes en réponse aux conditions environnementales du parasite, ce qui inclut l'hôte. En d'autres termes, la variation de la virulence ne serait pas liée à une variation du parasite en lui-même mais à

des facteurs pouvant altérer les interactions hôte-parasite ainsi que la résistance ou la tolérance de l'abeille. Cette dernière est en effet soumise à de multiples facteurs de stress, dont certains pourraient interagir avec *N. ceranae*. Il a par exemple été montré que la combinaison de *N. ceranae* avec une dose sublétalement d'insecticide neurotoxique induit une mortalité accrue des abeilles (Vidau *et al.*, 2011 ; Aufauvre *et al.*, 2012). L'infection et le développement de *N. ceranae* semblent en outre sensibles à la température et à la qualité des ressources (Chen *et al.* 2012, Di Pasquale *et al.*, 2013). Par ailleurs, le fond génétique de l'abeille constitue lui-même une source de variation de sa susceptibilité au parasite. Fontbonne *et al.* (2013) ont montré que la variabilité génétique des populations d'abeille pouvait moduler la sensibilité au parasite. En conclusion, les interactions entre *A. mellifera* et *N. ceranae* sont bien influencées par d'autres facteurs, ce qui expliquerait, au moins en partie, les différences de virulence observées chez les abeilles parasitées.

Les travaux sur la pathogénie et l'impact *N. ceranae* sur la santé de l'abeille peuvent donner des directions de recherche pour trouver des moyens de lutte ou de contrôle. Ainsi, puisque l'interaction entre l'hôte et le parasite semble modulée par différents facteurs environnementaux, il serait intéressant de rechercher les conditions dans lesquelles le parasite a le plus de difficulté (ou le plus de facilité) à se développer. De même, l'étude comparative de la sensibilité de taxons ou de sous-espèces d'abeilles à *N. ceranae* pourrait permettre de créer et de sélectionner des lignées d'abeilles résistantes ou tolérantes au parasite.

La seule molécule connue pour traiter la nosémosse est la Fumagilline. En Europe, elle est aujourd'hui interdite en apiculture car des résidus peuvent être retrouvés dans les matrices de la ruche, dont le miel (Rapport AFSSA, 2009). Identifier des facteurs de virulence, comme nous avons entrepris de le faire, permettrait de découvrir les mécanismes de l'infection, notamment la reconnaissance de l'hôte, et du cycle de vie du parasite, pour ensuite cibler des facteurs spécifiques au pathogène. Par exemple, chez *E. cuniculi*, le motif répété d'EnP1 semble impliqué dans la l'adhésion de la spore aux glycosaminoglycanes (GAG) présents à la surface des cellules hôtes (Southern *et al.*, 2007). S'il est en de même chez *N. ceranae*, des analogues aux GAG reconnus par ce motif chez l'abeille pourraient constituer un traitement contre l'invasion.

L'observation de l'effet des facteurs environnementaux sur la virulence de *N. ceranae* peut être replacée dans le contexte d'une origine multicausale du déclin des abeilles. Il est bien admis que l'abeille est affectée par de nombreux facteurs de stress biotiques et abiotiques. Les

activités humaines jouent cependant un rôle central. En effet, de nombreux stress sont dus aux modifications, contrôlées ou non, de l'environnement par l'homme: monocultures et remembrement qui altèrent les ressources, introduction d'espèces invasives (pathogènes, prédateurs comme le frelon asiatique), agropesticides, etc... Klee *et al.* (2007) ont aussi suggéré que la propagation de *N. ceranae* à travers le monde pourrait avoir été favorisée par les échanges commerciaux d'abeilles.

Cet impact fort des activités humaines sur les milieux naturels appelle probablement à plus de contrôle. Cependant, les conflits d'intérêt entre les apiculteurs, les agriculteurs, les groupes industriels agrochimiques et agroalimentaires, et même les consommateurs, ne simplifient pas les prises de décisions par les pouvoirs publics. Par exemple, alors que des apiculteurs pointent du doigt l'utilisation généralisée de pesticides, les groupes industriels vont avoir tendance à en minimiser les effets tout en appuyant le rôle essentiel des pesticides sur les rendements et les revenus agricoles. Pourtant la prise de conscience générale, et médiatisée, du déclin des abeilles appellent les gouvernants à réagir. L'intérêt de la recherche est d'apporter des pistes pour développer de nouveaux modes de contrôle de l'environnement (surveillance des pollinisateurs sauvages et des contaminants...), des règles sanitaires apicoles adaptées (contrôles sanitaires, utilisation de traitements...), ou des méthodologies de régulation et d'homologation des pesticides (doses testées sur abeilles, modes d'exposition...). En espérant que les réelles conséquences du déclin des pollinisateurs, espèces clefs de la biodiversité environnemental, ne soient pas connues avant qu'il ne soit trop tard.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

*« Nous ne disposons même pas du savoir
qui nous permettrait de mesurer notre ignorance »*

-- Bernard Werber, L'Empire des Anges --

Références bibliographiques

- ACHTMAN, M., WAIN, J., WEILL, F. X., NAIR, S., ZHOU, Z., SANGAL, V., KRAULAND, M. G., HALE, J. L., HARBOTTLE, H., UESBECK, A., DOUGAN, G., HARRISON, L. H. and BRISSE, S. (2012). *Multilocus* sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog*, **8**, e1002776.
- ALAU, C., DUCLOZ, F., CRAUSER, D. and LE CONTE, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol Lett*, **6**, 562-565.
- ALEXANDER, B. A. (1991). Phylogenetic analyses of the genus *Apis* (Hymenoptera: Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 137-149.
- ANANE, S. and ATTOUCHI, H. (2010). Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin Biol*, **34**, 450-464.
- ANDERSON, D. and EAST, I. J. (2008). The latest buzz about Colony Collapse Disorder. *Science*, **319**, 724-725.
- ANDERSON, D. L. and MORGAN, M. J. (2007). Genetic and morphological variation of bee-parasitic Tropilaelaps mites (Acari: Laelapidae): new and re-defined species. *Exp Appl Acarol*, **43**, 1-24.
- ANTUNEZ, K., MARTIN-HERNANDEZ, R., PRIETO, L., MEANA, A., ZUNINO, P. and HIGES, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ Microbiol*, **11**, 2284-2290.
- ARONSTEIN, K. A. and MURRAY, K. D. (2010). Chalkbrood disease in honey bees. *J Invertebr Pathol*, **103 Suppl 1**, S20-29.
- AUFAUVRE, J., BIRON, D. G., VIDAUD, C., FONTBONNE, R., ROUDEL, M., DIOGON, M., VIGUES, B., BELZUNCES, L. P., DELBAC, F. and BLOT, N. (2012). Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci Rep*, **2**, 326.
- BAILEY, T. L. and ELKAN, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, **2**, 28-36.
- BAKER, M. D., VOSSBRINCK, C. R., MADDOX, J. V. and UNDEEN, A. H. (1994). Phylogenetic relationships among Vairimorpha and Nosema species (Microspora) based on ribosomal RNA sequence data. *J Invertebr Pathol*, **64**, 100-106.
- BALBIANI, G. (1882). Sur les microsporidies ou sporospermies des articles. *Compte Rendu Academié Sciences*, **95**, 1168-1171.
- BECNEL, J. J. and ANDREADIS, T. G. (1999). Microsporidia in Insects. In "The Microsporidia and Microsporidiosis" (Murray Wittner, Eds), American Society for Microbiology. Washington, DC., 447-501.
- BENDSTEN, J. D., NIELSEN, H., VON HEIKNE, G. and BRUNAK, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.*, 783-795.
- BIDERRE, C., PAGES, M., METENIER, G., CANNING, E. U. and VIVARES, C. P. (1995). Evidence for the smallest nuclear genome (2.9 Mb) in the microsporidium Encephalitozoon cuniculi. *Mol Biochem Parasitol*, **74**, 229-231.
- BIESMEIJER, J. C., ROBERTS, S. P., REEMER, M., OHLEMULLER, R., EDWARDS, M., PEETERS, T., SCHAFFERS, A. P., POTTS, S. G., KLEUKERS, R., THOMAS, C. D., SETTELE, J. and KUNIN, W. E. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, **313**, 351-354.
- BIGLIARDI, E., SELMI, M. G., LUPETTI, P., CORONA, S., GATTI, S., SCAGLIA, M. and SACCHI, L. (1996). Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on Encephalitozoon hellem exospore. *J Eukaryot Microbiol*, **43**, 181-186.
- BIRKY, C. W., JR. (1996). Heterozygosity, heteromorphy, and phylogenetic trees in asexual eukaryotes. *Genetics*, **144**, 427-437.
- BLACQUIERE, T., SMAGGHE, G., VAN GESTEL, C. A. and MOMMAERTS, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, **21**, 973-992.

- BOECKING, O. and GENERSCH, E. (2008). Varroosis - the ongoing crisis in bee keeping. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, **3**, 221-228.
- BOHNE, W., FERGUSON, D. J., KOHLER, K. and GROSS, U. (2000). Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect Immun*, **68**, 2268-2275.
- BOTIAS, C., MARTIN-HERNANDEZ, R., GARRIDO-BAILON, E., GONZALEZ-PORTO, A., MARTINEZ-SALVADOR, A., DE LA RUA, P., MEANA, A. and HIGES, M. (2012). The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Res Vet Sci*, **93**, 150-155.
- BOURGEOIS, A. L., RINDERER, T. E., BEAMAN, L. D. and DANKA, R. G. (2010). Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *J Invertebr Pathol*, **103**, 53-58.
- BRADBPEAR, N. (2010). Le rôle des abeilles dans le développement rural, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), <http://www.fao.org/docrep/013/i0842f/i0842f0800.pdf>.
- BRANCHICCELA, M. B., MARTIN-HERNANDEZ, R., HIGES, M., ZUNINO, P. and ANTÚNEZ, K. (2013). Genetic diversity of *Nosema ceranae* assessed by Inter Sequence Simple Repetition (ISSR) technique. *Oral presentation for the XXXXIII Apimondia International Apicultural Congress, 29 sept. - 4 oct. 2013, Kyiv, Ukraine*.
- BROSSON, D., KUHN, L., PRENSIER, G., VIVARES, C. P. and TEXIER, C. (2005). The putative chitin deacetylase of *Encephalitozoon cuniculi*: a surface protein implicated in microsporidian spore-wall formation. *FEMS Microbiol Lett*, **247**, 81-90.
- BRYAN, R. T. and SCHWARTZ, D. A. (1999). Epidemiology of microsporidiosis. In: *The microsporidia and microsporidiosis*, edited by M. Wittner and L. M. Weiss 502-516.
- CALI, A. and TAKVORIAN, P. M. (1999). Developmental morphology and life cycle of the microsporidia. In: *"The Microsporidia and Microsporidiosis"*.
- CANNING, E. U. (1993). Microsporidia. In: *Parasite Protozoa*, edited by Kreier J.P., 299-370.
- CANNING, E. U. and LOM, J. (1986). The Microsporidia of vertebrate. *Academic Press, New York*, 1-289.
- CAPELLA-GUTIERREZ, S., MARCET-HOUBEN, M. and GABALDON, T. (2012). Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biol*, **10**, 47.
- CAVALIER-SMITH, T. (1983). A six-kingdom classification and a unified phylogeny. In **Endocytobiology II: Intracellular Space as Oligogenetic**, 1027-1034.
- CHAGNON, M. (2008). Causes et effets du déclin mondial des pollinisateurs et les moyens d'y remédier. *Fédération Canadienne de la Faune, Bureau régional du Québec*.
- CHAIMANEE, V., CHANTAWANNAKUL, P., CHEN, Y., EVANS, J. D. and PETTIS, J. S. (2012). Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *J Insect Physiol*, **58**, 1090-1095.
- CHAIMANEE, V., CHEN, Y., PETTIS, J. S., SCOTT CORNMAN, R. and CHANTAWANNAKUL, P. (2011). Phylogenetic analysis of *Nosema ceranae* isolated from European and Asian honeybees in Northern Thailand. *J Invertebr Pathol*, **107**, 229-233.
- CHAIMANEE, V., WARRIT, N. and CHANTAWANNAKUL, P. (2010). Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *J Invertebr Pathol*, **105**, 207-210.
- CHAUZAT, M.-P., HIGES, M., MARTIN-HERNANDEZ, R., MEANA, A., COUGOULE, N. and FAUCON, J.-P. (2007). Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *International Bee Research Association*, **46**, 127-128.
- CHEN, Y., PETTIS, J. S., ZHAO, Y., LIU, X., TALLON, L. J., SADZEWICZ, L. D., LI, R., ZHENG, H., HUANG, S., ZHANG, X., HAMILTON, M. C., PERNAL, S. F., MELATHOPOULOS, A. P., YAN, X. and EVANS, J. D. (2013). Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions. *BMC Genomics*, **14**, 451.
- CHEN, Y. P., EVANS, J. D., MURPHY, C., GUTELL, R., ZUKER, M., GUNDENSEN-RINDAL, D. and PETTIS, J. S. (2009). Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *J Eukaryot Microbiol*, **56**, 142-147.

- CHEN, Y. P. and SIEDE, R. (2007). Honey bee viruses. *Adv Virus Res*, **70**, 33-80.
- CHEN, Y. W., CHUNG, W. P., WANG, C. H., SOLTER, L. F. and HUANG, W. F. (2012). Nosema ceranae infection intensity highly correlates with temperature. *J Invertebr Pathol*, **111**, 264-267.
- CHENEY, S. A., LAFRANCHI-TRISTEM, N. J., BOURGES, D. and CANNING, E. U. (2001). Relationships of microsporidian genera, with emphasis on the polysporous genera, revealed by sequences of the largest subunit of RNA polymerase II (RPB1). *J Eukaryot Microbiol*, **48**, 111-117.
- CHOI, Y., LEE, Y., CHO, K. S., LEE, S., RUSSELL, J., CHOI, J. and JEONG, G. (2011). Chimerical nature of the ribosomal RNA gene of a Nosema species. *J Invertebr Pathol*, **107**, 86-89.
- COLOSS (2009). Conclusions of Workshop "Nosema disease: lack of knowledge and work standardization". <http://www.coloss.org/publications/Nosema-Workshop-Proceedings.pdf>.
- CORNMAN, R. S., CHEN, Y. P., SCHATZ, M. C., STREET, C., ZHAO, Y., DESANY, B., EGHOLM, M., HUTCHISON, S., PETTIS, J. S., LIPKIN, W. I. and EVANS, J. D. (2009). Genomic analyses of the microsporidian Nosema ceranae, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathog*, **5**, e1000466.
- CORRADI, N., POMBERT, J. F., FARINELLI, L., DIDIER, E. S. and KEELING, P. J. (2010). The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian Encephalitozoon intestinalis. *Nat Commun*, **1**, 77.
- COX-FOSTER, D. L., CONLAN, S., HOLMES, E. C., PALACIOS, G., EVANS, J. D., MORAN, N. A., QUAN, P. L., BRIESE, T., HORNIG, M., GEISER, D. M., MARTINSON, V., VANENGELSDORP, D., KALKSTEIN, A. L., DRYSDALE, A., HUI, J., ZHAI, J., CUI, L., HUTCHISON, S. K., SIMONS, J. F., EGHOLM, M., PETTIS, J. S. and LIPKIN, W. I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, **318**, 283-287.
- CROOKS, G. E., HON, G., CHANDONIA, J. M. and BRENNER, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*, **14**, 1188-1190.
- CUOMO, C. A., DESJARDINS, C. A., BAKOWSKI, M. A., GOLDBERG, J., MA, A. T., BECNEL, J. J., DIDIER, E. S., FAN, L., HEIMAN, D. I., LEVIN, J. Z., YOUNG, S., ZENG, Q. and TROEMEL, E. R. (2012). Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth. *Genome Res*, **22**, 2478-2488.
- CURGY, J., VAVRA, J. and VIVARÈS, C. (1980). Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. *Biol Cell*, **38**, 49-52.
- DAHLE, B. (2010). The role of *Varroa destructor* for honey bee colony losses in Norway. *Journal of Apicultural Research*, **49**, 124-125.
- DALL, D. J. (1983). A theory for the mechanism of polar filament extrusion in the Microspora. *J Theor Biol*, **105**, 647-659.
- DE MIRANDA, J. R., CORDONI, G. and BUDGE, G. (2010). The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol*, **103 Suppl 1**, S30-47.
- DE RIJK, P., GATEHOUSE, H. S. and DE WACHTER, R. (1998). The secondary structure of Nosema apis large subunit ribosomal RNA. *Biochim Biophys Acta*, **1442**, 326-328.
- DE RIJK, P., VAN DE PEER, Y., CHAPELLE, S. and DE WACHTER, R. (1994). Database on the structure of large ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3495-3501.
- DELBAC, F., PEUVEL, I., METENIER, G., PEYRETAILLADE, E. and VIVARES, C. P. (2001). Microsporidian invasion apparatus: identification of a novel polar tube protein and evidence for clustering of ptp1 and ptp2 genes in three Encephalitozoon species. *Infect Immun*, **69**, 1016-1024.
- DELBAC, F., PEYRET, P., METENIER, G., DAVID, D., DANCHIN, A. and VIVARES, C. P. (1998). On proteins of the microsporidian invasive apparatus: complete sequence of a polar tube protein of Encephalitozoon cuniculi. *Mol Microbiol*, **29**, 825-834.
- DESORTES, I., LE CHARPENTIER, Y., GALIAN, A., BERNARD, F., COCHAND-PRIOLETT, B., LAVERGNE, A., RAVISSE, P. and MODIGLIANI, R. (1985). Occurrence of a new microsporidian: Enterocytozoon bienewisi n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J Protozool*, **32**, 250-254.
- DESORTES-LIVAGE, I. (1996). Human microsporidiosis and AIDS: recent advances. *Parasite*, **3**, 107-113.

- DI PASQUALE, G., SALIGNON, M., LE CONTE, Y., BELZUNCES, L. P., DECOURTYE, A., KRETZSCHMAR, A., SUCHAIL, S., BRUNET, J. L. and ALAUX, C. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS One*, **8**, e72016.
- DIDIER, E. S., SNOWDEN, K. F. and SHADDUCK, J. A. (1998). Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv Parasitol*, **40**, 283-320.
- DIDIER, E. S., VOSSBRINCK, C. R., BAKER, M. D., ROGERS, L. B., BERTUCCI, D. C. and SHADDUCK, J. A. (1995). Identification and characterization of three Encephalitozoon cuniculi strains. *Parasitology*, **111** (Pt 4), 411-421.
- DIDIER, E. S. and WEISS, L. M. (2006). Microsporidiosis: current status. *Current opinion in infectious diseases*, **19**, 485-492.
- DONG, S., SHEN, Z., ZHU, F., TANG, X. and XU, L. (2011). Complete sequence and gene organization of the Nosema heliothidis ribosomal RNA gene region. *J Eukaryot Microbiol*, **58**, 539-541.
- DOVER, G. and COEN, E. (1981). Springcleaning ribosomal DNA: a model for multigene evolution? *Nature*, **290**, 731-732.
- DOWD, S. E., GERBA, C. P. and PEPPER, I. L. (1998). Confirmation of the human-pathogenic microsporidia Enterocytozoon bienersi, Encephalitozoon intestinalis, and Vittaforma corneae in water. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 3332-3335.
- DUNN, A. M. and SMITH, J. E. (2001). Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. *Microbes Infect*, **3**, 381-388.
- DUSSAUBAT, C., BRUNET, J. L., HIGES, M., COLBOURNE, J. K., LOPEZ, J., CHOI, J. H., MARTIN-HERNANDEZ, R., BOTIAS, C., COUSIN, M., MCDONNELL, C., BONNET, M., BELZUNCES, L. P., MORITZ, R. F., LE CONTE, Y. and ALAUX, C. (2012). Gut pathology and responses to the microsporidium Nosema ceranae in the honey bee Apis mellifera. *PLoS One*, **7**, e37017.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G. and SCHNEIDER, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*, **1**, 47-50.
- FAO (2009). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT). <http://faostat.fao.org>.
- FENOY, S., RUEDA, C., HIGES, M., MARTIN-HERNANDEZ, R. and DEL AGUILA, C. (2009). High-level resistance of Nosema ceranae, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl Environ Microbiol*, **75**, 6886-6889.
- FLECK, O. and NIELSEN, O. (2004). DNA repair. *J Cell Sci*, **117**, 515-517.
- FONTBONNE, R., GARNERY, L., VIDAUD, C., AUFAUVRE, J., TEXIER, C., TCHAMITCHIAN, S., ALAOUI, H. E., BRUNET, J. L., DELBAC, F. and BIRON, D. G. (2013). Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite Nosema ceranae. *Infect Genet Evol*, **17**, 188-194.
- FORSGREN, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, S5-S9.
- FORSGREN, E. and FRIES, I. (2013). Temporal study of Nosema spp. in a cold climate. *Environ Microbiol Rep*, **5**, 78-82.
- FOUCAULT, C. and DRANCOURT, M. (2000). Actin mediates Encephalitozoon intestinalis entry into the human enterocyte-like cell line, Caco-2. *Microb Pathog*, **28**, 51-58.
- FRIES, I. (2010). Nosema ceranae in European honey bees (Apis mellifera). *J Invertebr Pathol*, **103** Suppl 1, S73-79.
- FRIES, I., FENG, F., DA SILVA, A., SLEMENDA, S. B. and PIENIAZEK, N. J. (1996). Nosema ceranae sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the honey bee Apis cerana (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, **32**, 356-365.
- FRIES, I., MARTIN-HERNANDEZ, R., MEANA, A., GARCIA-PALENCIA, P. and HIGES, M. (2006). Natural infections of Nosema ceranae in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*, **45**, 230-233.
- FRIXIONE, E., RUIZ, L., SANTILLÁN, M., DE VARGAS, L. V., TEJERO, J. M. AND UNDEEN, A. H. (1992). Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 38-50.
- FU, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 915-925.

- FUENTES, J. (2008). Flowers' fragrance diminished by air pollution. *Journal of Atmospheric Environment, University of Virginia*.
- GALLAI, N., SALLES, J. M., SETTELE, J. and VAISSIERE, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, **68**.
- GAREDEW, A., SCHMOLZ, E. and LAMPRECHT, I. (2004). The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, **35**, 419-430.
- GARRIDO-BAILON, E., BARTOLOME, C., PRIETO, L., BOTIAS, C., MARTINEZ-SALVADOR, A., MEANA, A., MARTIN-HERNANDEZ, R. and HIGES, M. (2012). The prevalence of *Acarapis woodi* in Spanish honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Exp Parasitol*, **132**, 530-536.
- GATEHOUSE, H. S. and MALONE, L. A. (1998). The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *J Invertebr Pathol*, **71**, 97-105.
- GENERSCH, E. (2008). *Paenibacillus larvae* and American Foulbrood – long since known and still surprising. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, **3**, 429-434.
- GENERSCH, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol*, **103 Suppl 1**, S10-19.
- GERMOT, A., PHILIPPE, H. and LE GUYADER, H. (1997). Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol Biochem Parasitol*, **87**, 159-168.
- GIERSCH, T., BERG, T., GALEA, F. and HORNITZKY, M. (2009). *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie*, **40**, 117-123.
- GILL, E. E. and FAST, N. M. (2007). Stripped-down DNA repair in a highly reduced parasite. *BMC Mol Biol*, **8**, 24.
- GISDER, S., HEDTKE, K., MOCKEL, N., FRIELITZ, M. C., LINDE, A. and GENERSCH, E. (2010). Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl Environ Microbiol*, **76**, 3032-3038.
- GOBLIRSCH, M., HUANG, Z. Y. and SPIVAK, M. (2013). Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS One*, **8**, e58165.
- GOERTZ, D., SOLTER, L. F. and LINDE, A. (2007). Horizontal and vertical transmission of a *Nosema* sp. (Microsporidia) from *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). *J Invertebr Pathol*, **95**, 9-16.
- GROB, U. (2003). Treatment of microsporidiosis including albendazole. *Parasitol Res*, **90** s14-s18.
- HAAG, K. L., SHEIKH-JABBARI, E., BEN-AMI, F. and EBERT, D. (2013). Microsatellite and single-nucleotide polymorphisms indicate recurrent transitions to asexuality in a microsporidian parasite. *J Evol Biol*, **26**, 1117-1128.
- HALL, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 95-98.
- HARPUR, B. A., MINAEI, S., KENT, C. F. and ZAYED, A. (2012). Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Mol Ecol*, **21**, 4414-4421.
- HARTMANN, U., CHARRIÈRE, J. D., LODESANI, M. and NEUMANN, P. (2009). To bee or not to bee: differential mortality induced by *Nosema ceranae*? *Workshop "Nosema disease: lack of knowledge and work standardization" See COLOSS 2009*.
- HARTSKEERL, R. A., SCHUITEMA, A. R. and DEWACHTER, R. (1993). Secondary structure of the small subunit ribosomal RNA sequence of the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi*. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1489.
- HATJINA, F., TSOKTOURIDIS, G., BOUGA, M., CHARISTOS, L., EVANGELOU, V., AVTZIS, D., MEEUS, I., BRUNAIN, M., SMAGGHE, G. and DE GRAAF, D. C. (2011). Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *J Invertebr Pathol*, **108**, 131-134.
- HAYMAN, J. R., HAYES, S. F., AMON, J. and NASH, T. E. (2001). Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Infect Immun*, **69**, 7057-7066.
- HAZARD, E. I. and BROOKBANK, J. W. (1984). Karyotype and meiosis in an *Amblyospora* sp. (Microspora) in the mosquito *Culex salinarius*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **44**, 3-11.

- HIGES, M., GARCIA-PALENCIA, P., MARTIN-HERNANDEZ, R. and MEANA, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J Invertebr Pathol*, **94**, 211-217.
- HIGES, M., JUARRANZ, A., DIAS-ALMEIDA, J., LUCENA, S., BOTIAS, C., MEANA, A., GARCIA-PALENCIA, P. and MARTIN-HERNANDEZ, R. (2013). Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol Rep*, **5**, 530-536.
- HIGES, M., MARTIN, R. and MEANA, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol*, **92**, 93-95.
- HIGES, M., MARTIN-HERNANDEZ, R., BOTIAS, C., BAILON, E. G., GONZALEZ-PORTO, A. V., BARRIOS, L., DEL NOZAL, M. J., BERNAL, J. L., JIMENEZ, J. J., PALENCIA, P. G. and MEANA, A. (2008b). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol*, **10**, 2659-2669.
- HIGES, M., MARTIN-HERNANDEZ, R., GARCIA-PALENCIA, P., MARIN, P. and MEANA, A. (2009b). Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol Rep*, **1**, 495-498.
- HIGES, M., MARTIN-HERNANDEZ, R., GARRIDO-BAILON, E., GARCIA-PALENCIA, P. and MEANA, A. (2008a). Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *J Invertebr Pathol*, **97**, 76-78.
- HIGES, M., MARTIN-HERNANDEZ, R., GARRIDO-BAILON, E., GARCIA-PALENCIA, P. and MEANA, A. (2009a). First detection of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *Journal of Apicultural Research*, **48**, 217-219.
- HIGES, M., MARTIN-HERNANDEZ, R. and MEANA, A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, **41**, 375-392.
- HIRT, R. P., HEALY, B., VOSSBRINCK, C. R., CANNING, E. U. and EMBLEY, T. M. (1997). A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr Biol*, **7**, 995-998.
- HUANG, W. F., BOCQUET, M., LEE, K. C., SUNG, I. H., JIANG, J. H., CHEN, Y. W. and WANG, C. H. (2008). The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *J Invertebr Pathol*, **97**, 9-13.
- HUANG, W. F., JIANG, J. H., CHEN, Y. W. and WANG, C. H. (2007). A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*, **38**, 30-37.
- HUANG, W. F. and SOLTER, L. F. (2013). Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *J Invertebr Pathol*, **113**, 35-41.
- HUANG, W. F., TSAI, S. J., LO, C. F., SOICHI, Y. and WANG, C. H. (2004). The novel organization and complete sequence of the ribosomal RNA gene of *Nosema bombycis*. *Fungal Genet Biol*, **41**, 473-481.
- IYAMA, K., CHIEDA, Y., YASUNAGA-AOKI, C., HAYASAKA, S. and SHIMIZU, S. (2004). Analyses of the ribosomal DNA region in *Nosema bombycis* NIS 001. *J Eukaryot Microbiol*, **51**, 598-604.
- INVERNIZZI, C., ABUD, C., TOMASCO, I. H., HARRIET, J., RAMALLO, G., CAMPA, J., KATZ, H., GARDIOL, G. and MENDOZA, Y. (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J Invertebr Pathol*, **101**, 150-153.
- IRONSIDE, J. E. (2007). Multiple losses of sex within a single genus of Microsporidia. *BMC Evol Biol*, **7**, 48.
- IRONSIDE, J. E. (2013). Diversity and recombination of dispersed ribosomal DNA and protein coding genes in microsporidia. *PLoS One*, **8**, e55878.
- ISHIHARA, R. and HAYASHIN, Y. (1968). Some properties of ribosomes from the sporoplasm of *N. bombycis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **11**, 377-385.
- JOHNSON, R. M., DAHLGREN, L., SIEGFRIED, B. D. and ELLIS, M. D. (2013). Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bee (*Apis mellifera*). *PLoS One*, **8**.
- JUMP, A. S. and PENUELAS, J. (2006). Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8096-8100.

- KATINKA, M. D., DUPRAT, S., CORNILLON, E., METENIER, G., THOMARAT, F., PRENSIER, G., BARBE, V., PEYRETAILLADE, E., BROTTIER, P., WINCKER, P., DELBAC, F., EL ALAOU, H., PEYRET, P., SAURIN, W., GOUY, M., WEISSENBAACH, J. and VIVARES, C. P. (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, **414**, 450-453.
- KEARNS, C. A. and INOUE, D. W. (1997). Pollinators, flowering plants, and conservation biology. *BioScience*, **47**, 297-307.
- KEELING, P. (2009). Five questions about microsporidia. *PLoS Pathog*, **5**, e1000489.
- KEELING, P. J. and FAST, N. M. (2002). Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol*, **56**, 93-116.
- KEN, T., HEPBURN, H. R., RADLOFF, S. E., YUSHENG, Y., YIQIU, L., DANYIN, Z. and NEUMANN, P. (2005). Heat-balling wasps by honeybees. *Naturwissenschaften*, **92**, 492-495.
- KEOHANE, E. M., ORR, G. A., ZHANG, H. S., TAKVORIAN, P. M., CALI, A., TANOWITZ, H. B., WITTNER, M. and WEISS, L. M. (1998). The molecular characterization of the major polar tube protein gene from *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite of humans. *Mol Biochem Parasitol*, **94**, 227-236.
- KLEE, J., BESANA, A. M., GENERSCH, E., GISDER, S., NANETTI, A., TAM, D. Q., CHINH, T. X., PUERTA, F., RUZ, J. M., KRYGER, P., MESSAGE, D., HATJINA, F., KORPELA, S., FRIES, I. and PAXTON, R. J. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol*, **96**, 1-10.
- KLEIN, A. M., VAISSIERE, B. E., CANE, J. H., STEFFAN-DEWENTER, I., CUNNINGHAM, S. A., KREMEN, C. and TSCHARNTKE, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc Biol Sci*, **274**, 303-313.
- KOESTLER, T. and EBERSBERGER, I. (2011). Zygomycetes, microsporidia, and the evolutionary ancestry of sex determination. *Genome Biol Evol*, **3**, 186-194.
- KRALJ, J. and FUCHS, S. (2010). *Nosema* spp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie*, **41**, 21-28.
- KU, C. T., WANG, C. Y., TSAI, Y. C., TZENG, C. C. and WANG, C. H. (2007). Phylogenetic analysis of two putative *Nosema* isolates from Cruciferous Lepidopteran pests in Taiwan. *J Invertebr Pathol*, **95**, 71-76.
- LAMBERT, O., PIROUX, M., PUYO, S., THORIN, C., LARHANTEC, M., DELBAC, F. and POULIQUEN, H. (2012a). Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. *Environ Pollut*, **170**, 254-259.
- LAMBERT, O., PIROUX, M., PUYO, S., THORIN, C., L'HOSTIS, M., WIEST, L., BULETE, A., DELBAC, F. and POULIQUEN, H. (2013). Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France. *PLoS One*, **8**, e67007.
- LAMBERT, O., VEYRAND, B., DURAND, S., MARCHAND, P., LE BIZEC, B., PIROUX, M., PUYO, S., THORIN, C., DELBAC, F. and POULIQUEN, H. (2012b). Polycyclic aromatic hydrocarbons: bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere*, **86**, 98-104.
- LECOINTRE, G. and LE GUYADER, H. (2001). Classification phylogénétique du vivant. Belin, Paris. 560p.
- LEE, R. C., WILLIAMS, B. A., BROWN, A. M., ADAMSON, M. L., KEELING, P. J. and FAST, N. M. (2008a). Alpha- and beta-tubulin phylogenies support a close relationship between the microsporidia *Brachiola algerae* and *Antonospora locustae*. *J Eukaryot Microbiol*, **55**, 388-392.
- LEE, S. C., CORRADI, N., BYRNES, E. J., 3RD, TORRES-MARTINEZ, S., DIETRICH, F. S., KEELING, P. J. and HEITMAN, J. (2008b). Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Curr Biol*, **18**, 1675-1679.
- LEE, S. C., NI, M., LI, W., SHERTZ, C. and HEITMAN, J. (2010). The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiol Mol Biol Rev*, **74**, 298-340.
- LI, J., CHEN, W., WU, J., PENG, W., AN, J., SCHMID-HEMPEL, P. and SCHMID-HEMPEL, R. (2012). Diversity of *Nosema* associated with bumblebees (*Bombus* spp.) from China. *International Journal of Parasitology*, **42**, 49-61.
- LI, Y., WU, Z., PAN, G., HE, W., ZHANG, R., HU, J. and ZHOU, Z. (2009). Identification of a novel spore wall protein (SWP26) from microsporidia *Nosema bombicis*. *Int J Parasitol*, **39**, 391-398.

- LI, Z., PAN, G., LI, T., HUANG, W., CHEN, J., GENG, L., YANG, D., WANG, L. and ZHOU, Z. (2011). SWP5, a spore wall protein, interacts with polar tube proteins in the parasitic microsporidian *Nosema bombycis*. *Eukaryot Cell*, **11**, 229-237.
- LIBRADO, P. and ROZAS, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- LIGUORY, O., DAVID, F., SARFATI, C., DEROUIN, F. and MOLINA, J. M. (1998). Determination of types of *Enterocytozoon bienersi* strains isolated from patients with intestinal microsporidiosis. *J Clin Microbiol*, **36**, 1882-1885.
- LIU, H., PAN, G., SONG, S., XU, J., LI, T., DENG, Y. and ZHOU, Z. (2008). Multiple rDNA units distributed on all chromosomes of *Nosema bombycis*. *J Invertebr Pathol*, **99**, 235-238.
- LO, N., GLOAG, R. S., ANDERSON, D. L. and OLDROYD, B. P. (2010). A molecular phylogeny of the genus *Apis* suggests that the Giant Honey Bee of the Philippines, *A. breviligula* Maa, and the Plains Honey Bee of southern India, *A. indica* Fabricius, are valid species. *Systematic Entomology*, **35**, 226-233.
- LOUBES, C., MAURAND, J. and ROUSSET-GALANGAU, V. (1976). [Presence of synaptonematic complexes in the biological cycle of *Gurleya chironomi* Loubes and Maurand, 1975: an argument in favor of sexuality in microsporidia]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, **282**, 1025-1027.
- MARTIN, S. J. (2001b). The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *Journal of Applied Ecology*, **38**, 1082-1093.
- MARTIN, S. J. (2001a). *Varroa destructor* reproduction during the winter in *Apis mellifera* colonies in UK. *Exp Appl Acarol*, **25**, 321-325.
- MARTIN, S. J. and JONES, S. L. (2007). Apicultural Research on *Varroa*. *IRBA, Cardiff, UK*.
- MARTIN-HERNANDEZ, R., BOTIAS, C., BAILON, E. G., MARTINEZ-SALVADOR, A., PRIETO, L., MEANA, A. and HIGES, M. (2011a). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ Microbiol*, **14**, 2127-2138.
- MARTIN-HERNANDEZ, R., BOTIAS, C., BARRIOS, L., MARTINEZ-SALVADOR, A., MEANA, A., MAYACK, C. and HIGES, M. (2011b). Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol Res*, **109**, 605-612.
- MARTIN-HERNANDEZ, R., MEANA, A., PRIETO, L., SALVADOR, A. M., GARRIDO-BAILON, E. and HIGES, M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 6331-6338.
- MATHIS, A., MICHEL, M., KUSTER, H., MULLER, C., WEBER, R. and DEPLAZES, P. (1997). Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. *Parasitology*, **114** (Pt 1), 29-35.
- MATHIS, A., TANNER, I., WEBER, R. and DEPLAZES, P. (1999). Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *Int J Parasitol*, **29**, 767-770.
- MATSUBAYASHI, H., KOIKE, T., MIKATA, T. and HAGIWARA, S. (1959). A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Arch. Pathol.*, **67**, 181-187.
- MEDICI, S. K., SARLO, E. G., PORRINI, M. P., BRAUNSTEIN, M. and EGUARAS, M. J. (2011). Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitol Res*, **110**, 859-864.
- MONAGHAN, S. R., RUMNEY, R. L., VO, N. T., BOLS, N. C. and LEE, L. E. (2011). In vitro growth of microsporidia *Anncaliia algerae* in cell lines from warm water fish. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **47**, 104-113.
- MOODIE, E. G., LE JAMBRE, L. F. and KATZ, M. E. (2003). Ultrastructural characteristics and small subunit ribosomal DNA sequence of *Vairimorpha cheracis* sp. nov., (Microspora: Burenellidae), a parasite of the Australian yabby, *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). *J Invertebr Pathol*, **84**, 198-213.
- MULLIN, C. A., FRAZIER, M., FRAZIER, J. L., ASHCRAFT, S., SIMONDS, R., VANENGELSDORP, D. and PETTIS, J. S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One*, **5**, e9754.
- NÄGELI, K. (1857). Über die neue Krankheit des Seidenraupe und verwandte Organismen. *Botanische Zeitung*, **15**, 760-761.
- NATURAL_RESEARCH_COUNCIL (2006). Status of pollinator in North America. In *National Academic Press*.

- NEI, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **70**, 3321-3323.
- NEI, M. and KAMUR, S. (2000). Molecular evolution and phylogenetics. *Oxford University Press, New York, NY, USA*.
- NEI, M. and ROONEY, A. P. (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet*, **39**, 121-152.
- NEUMANN, P. and CARRECK, N. L. (2010). Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, **49**, 1-6.
- OERKE, E. C. and DEHNE, H. W. (2004). Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. *Crop. Prot.*, **23**, 275-285.
- OIE (2008). Manuel Terrestre de l'organisation mondiale de la santé animale. <http://www.oie.int/fr/normes-internationales/manuel-terrestre/acces-en-ligne/>.
- OIE (2013). Manuel Terrestre de l'organisation mondiale de la santé animale. <http://www.oie.int/fr/normes-internationales/manuel-terrestre/acces-en-ligne/>.
- O'MAHONY, E. M., TAY, W. T. and PAXTON, R. J. (2007). Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi*. *J Eukaryot Microbiol*, **54**, 103-109.
- OTTO, S. P. (2007). The evolutionary consequence of polyploidy. *Cell*, **131**, 452-462.
- PARMESAN, C. (2006). Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **37**, 637-669.
- PASTEUR, L. (1870). Etudes sur la maladie des vers à soie : moyen pratique assuré de la combattre et d'en prévenir le retour. Gauthier-Villars, Paris, France. 322 (t.1) et 327 (t.2) pp.
- PAXTON, R. J., KLEE, J., KORPELA, S. and FRIES, I. (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, **38**, 7.
- PETERSEN, T. N., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G. and NIELSEN, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, **8**, 785-786.
- PEUVEL, I., PEYRET, P., METENIER, G., VIVARES, C. P. and DELBAC, F. (2002). The microsporidian polar tube: evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol Biochem Parasitol*, **122**, 69-80.
- PEUVEL-FANGET, I., POLONAI, V., BROSSON, D., TEXIER, C., KUHN, L., PEYRET, P., VIVARES, C. and DELBAC, F. (2006). EnP1 and EnP2, two proteins associated with the *Encephalitozoon cuniculi* endospore, the chitin-rich inner layer of the microsporidian spore wall. *Int J Parasitol*, **36**, 309-318.
- PEYRETAILLADE, E., BIDERRE, C., PEYRET, P., DUFFIEUX, F., METENIER, G., GOUY, M., MICHOT, B. and VIVARES, C. P. (1998b). Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rRNA reduced to the universal core. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3513-3520.
- PEYRETAILLADE, E., BROUSSOLLE, V., PEYRET, P., METENIER, G., GOUY, M. and VIVARES, C. P. (1998a). Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. *Mol Biol Evol*, **15**, 683-689.
- PFENNIG, K. S. (2001). Evolution of pathogen virulence: the role of variation in host phenotype. *Proc Biol Sci*, **268**, 755-760.
- PLESHINGER, J. and WEIDNER, E. (1985). The microsporidian spore invasion tube. IV. Discharge activation begins with pH-triggered Ca²⁺ influx. *J Cell Biol*, **100**, 1834-1838.
- PLISCHUK, S., MARTIN-HERNANDEZ, R., PRIETO, L., LUCIA, M., BOTIAS, C., MEANA, A., ABRAHAMOVICH, A. H., LANGE, C. and HIGES, M. (2009). South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol Rep*, **1**, 131-135.
- POLONAI, V., BELKORCHIA, A., ROUSSEL, M., PEYRETAILLADE, E., PEYRET, P., DIOGON, M. and DELBAC, F. (2013). Identification of two new polar tube proteins related to polar tube protein 2 in the microsporidian *Antonospora locustae*. *FEMS Microbiol Lett*.

- POLONAIS, V., MAZET, M., WAWRZYNIAK, I., TEXIER, C., BLOT, N., EL ALAOUI, H. and DELBAC, F. (2010). The human microsporidian *Encephalitozoon hellem* synthesizes two spore wall polymorphic proteins useful for epidemiological studies. *Infect Immun*, **78**, 2221-2230.
- POLONAIS, V., PRENSIER, G., METENIER, G., VIVARES, C. P. and DELBAC, F. (2005). Microsporidian polar tube proteins: highly divergent but closely linked genes encode PTP1 and PTP2 in members of the evolutionarily distant Antonospora and Encephalitozoon groups. *Fungal Genet Biol*, **42**, 791-803.
- POLZ, M. F. and CAVANAUGH, C. M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 3724-3730.
- POTTS, S. G., BIESMEIJER, J. C., KREMEN, C., NEUMANN, P., SCHWEIGER, O. and KUNIN, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol*, **25**, 345-353.
- RAMESH, M. A., MALIK, S. B. and LOGSDON, J. M., JR. (2005). A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Curr Biol*, **15**, 185-191.
- RAMIREZ-SORIANO, A., RAMOS-ONSINS, S. E., ROZAS, J., CALAFELL, F. and NAVARRO, A. (2008). Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*, **179**, 555-567.
- RAMOS-ONSINS, S. E. and ROZAS, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol Biol Evol*, **19**, 2092-2100.
- RIBIÈRE, M., BALL, B. and AUBERT, M. F. A. (2008). Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. *In Virology and the honey bee*.
- ROME, Q., PERRARD, A., MULLER, F. and VILLEMANT, C. (2011). Monitoring and control modalities of a honeybee predator, the yellow-legged hornet *vespa velutina migrithorax* (Hymenoptera: Vespidae). *Aliens*, **31**, 7-15.
- ROSENKRANZ, P., AUMEIER, P. and ZIEGELMANN, B. (2010). Biology and control of Varroa destructor. *J Invertebr Pathol*, **103 Suppl 1**, S96-119.
- ROZAS, J. (2009). DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP. *Methods Mol Biol*, **537**, 337-350.
- ROZAS, J., GULLAUD, M., BLANDIN, G. and AGUADE, M. (2001). DNA variation at the rp49 gene region of *Drosophila simulans*: evolutionary inferences from an unusual haplotype structure. *Genetics*, **158**, 1147-1155.
- SAGASTUME, S., DEL AGUILA, C., MARTIN-HERNANDEZ, R., HIGES, M. and HENRIQUES-GIL, N. (2011). Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees. *Environ Microbiol*, **13**, 84-95.
- SAGASTUME, S., MARTIN-HERNANDEZ, R., HIGES, M. and HENRIQUES-GIL, N. Ribosomal Gene Polymorphism in Small Genomes: Analysis of Different 16S rRNA Sequences Expressed in the Honeybee Parasite *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J Eukaryot Microbiol*.
- SAK, B., KVAC, M., PETRZELKOVA, K., KVETONOVA, D., POMAJBIKOVA, K., MULAMA, M., KIYANG, J. and MODRY, D. (2011). Diversity of microsporidia (Fungi: Microsporidia) among captive great apes in European zoos and African sanctuaries: evidence for zoonotic transmission? *Folia Parasitol (Praha)*, **58**, 81-86.
- SAMMATARO, D., GERSON, U. and NEEDHAM, G. (2000). Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annu Rev Entomol*, **45**, 519-548.
- SAMPSON, B. J. and CANE, J. H. (1999). Impact of enhanced ultraviolet-B radiation on flower, pollen, and nectar production. *Am J Bot*, **86**, 108-114.
- SANDFORT, J., HANNEMANN, A., GELDERBLOM, H., STARK, K., OWEN, R. L. and RUF, B. (1994). Enterocytozoon bienersi infection in an immunocompetent patient who had acute diarrhea and who was not infected with the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*, **19**, 514-516.
- SANTIN, M. and FAYER, R. (2009). Enterocytozoon bienersi genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. *J Eukaryot Microbiol*, **56**, 34-38.
- SCHOCH, C. L., SEIFERT, K. A., HUHNDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J. L., LEVESQUE, C. A. and CHEN, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 6241-6246.

- SCHWANDER, T. and LEIMAR, O. (2011). Genes as leaders and followers in evolution. *Trends Ecol Evol*, **26**, 143-151.
- SEELEY, T. D. (1985). Honeybee ecology. *Princeton University Press*.
- SELMAN, M., SAK, B., KVAC, M., FARINELLI, L., WEISS, L. M. and CORRADI, N. (2013). Extremely reduced levels of heterozygosity in the vertebrate pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Eukaryot Cell*, **12**, 496-502.
- SHEN, M., CUI, L., OSTIGUY, N. and COX-FOSTER, D. (2005a). Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J Gen Virol*, **86**, 2281-2289.
- SHEN, M., YANG, X., COX-FOSTER, D. and CUI, L. (2005b). The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology*, **342**, 141-149.
- SHEPPARD, W. S. (1988). Comparative study of enzyme polymorphism in United States and European Honey bee (*Hymenoptera*, *Apidae*) populations. *Annals of the Entomological Society of America*, 886-889.
- SHEPPARD, W. S. (2012). Honey bee genetic diversity and breeding - towards the reintroduction of European Germplasm. *Amercian Bee Journal*, 155-158.
- SMITH, M. L. (2012). The honey bee parasite *Nosema ceranae*: transmissible via food exchange? *PLoS One*, **7**, e43319.
- SOKOLOVA, Y., SNIGIREVSKAYA, E., MORZHINA, E., SKARLATO, S., MIRONOV, A. and KOMISSARCHIK, Y. (2001a). Visualization of early golgi compartments at proliferate and sporogenic stages of a microsporidian *Nosema grylli*. *J Eukaryot Microbiol*, **Suppl**, 86S-87S.
- SOKOLOVA, Y., SNIGIREVSKAYA, E. S., SKARLATO, S. O., KOMISSARCHIK, Y. Y. and MIRONOV, A. A. (2001b). Unusual Golgi apparatus at the proliferative stage of microsporidian life cycle. *Dokl Biol Sci*, **378**, 290-293.
- SOUTHERN, T. R., JOLLY, C. E., LESTER, M. E. and HAYMAN, J. R. (2007). EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells in vitro. *Eukaryot Cell*, **6**, 1354-1362.
- SPRAGUE, V. (1977). Systematics of the Microsporidia. *New York: Plenum Press*, **2**, 1-510.
- STEVANOVIC, J., STANIMIROVIC, Z., GENERSCH, E., KOVACEVIC, S. R., LJUBENKOVIC, J., RADAKOVIC, M. and ALEKSIC, N. (2010). Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie*, **42**, 49-58.
- STOUT, J. C. and MORALES, C. L. (2009). Ecological impacts of invasive alien species on bees. *Apidologie*, **40**, 388-409.
- SUMNER, D. A. and BORISS, H. (2006). Bee-economics and the Leap in Pollination Fees. . *University of California, Agricultural Issues Center, Giannini Foundation of Agricultural Economics*.
- SUMNER, D. A. and BORRIS, H. (2006). Bee-economics and the leap in pollination Fees. http://giannini.ucop.edu/media/are-update/files/articles/v9n3_3.pdf.
- TAJIMA, F. (1989). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 597-601.
- TAKVORIAN, P. M. and CALI, A. (1994). Enzyme histochemical identification of the Golgi apparatus in the microsporidian, *Glugea stephani*. *J Eukaryot Microbiol*, **41**, 63S-64S.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. and KUMAR, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, **28**, 2731-2739.
- TAPASZTI, Z., FORGACH, P., KOVAGO, C., BEKESI, L., BAKONYI, T. and RUSVAI, M. (2009). First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. *Acta Vet Hung*, **57**, 383-388.
- TARPY, D. R. (2003). Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proc Biol Sci*, **270**, 99-103.
- TARPY, D. R., VANENGELSDORP, D. and PETTIS, J. S. (2013). Genetic diversity affects colony survivorship in commercial honey bee colonies. *Naturwissenschaften*.
- TAY, W. T., O'MAHONY, E. M. and PAXTON, R. J. (2005). Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites. *J Eukaryot Microbiol*, **52**, 505-513.

- TEACHER, A. G. and GRIFFITHS, D. J. (2011). HapStar: automated haplotype network layout and visualization. *Mol Ecol Resour*, **11**, 151-153.
- TELLIER, A. and BROWN, J. K. (2007). Polymorphism in *multilocus* host parasite coevolutionary interactions. *Genetics*, **177**, 1777-1790.
- THOMARAT, F., VIVARES, C. P. and GOUY, M. (2004). Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *J Mol Evol*, **59**, 780-791.
- THOMAS, J. O. and TRAVERS, A. A. (2001). HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci*, **26**, 167-174.
- TRAVER, B. E. and FELL, R. D. (2011). Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *J Invertebr Pathol*, **107**, 43-49.
- TREMOULET, A. H., AVILA-AGUERO, M. L., PARIS, M. M., CANAS-COTO, A., ULLOA-GUTIERREZ, R. and FAINGEZICHT, I. (2004). Albendazole therapy for *Microsporidium* diarrhea in immunocompetent Costa Rican children. *Pediatr Infect Dis J*, **23**, 915-918.
- TSAI, S. J., HUANG, W. F. and WANG, C. H. (2005). Complete sequence and gene organization of the *Nosema* spodopterae rRNA gene. *J Eukaryot Microbiol*, **52**, 52-54.
- TSAOUSIS, A. D., KUNJI, E. R., GOLDBERG, A. V., LUCOCQ, J. M., HIRT, R. P. and EMBLEY, T. M. (2008). A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, **453**, 553-556.
- UNDEEN, A. H. and VANDER MEER, R. K. (1999). Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *J Invertebr Pathol*, **73**, 294-302.
- UNDERWOOD, R. and VANENGELSDORP, D. (2007). Colony Collapse Disorder: Have we seen this before? *Bee Culture*, **137**, 13-18.
- VAISSIÈRE, B. (2006). Pollinisation, apiculture et environnement: La pollinisation. *Traité Rustica de l'apiculture*, édition 2006, **Chapitre 4**.
- VAN DE PEER, Y., BEN ALI, A. and MEYER, A. (2000). Microsporidia: accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi. *Gene*, **246**, 1-8.
- VANENGELSDORP, D., CARON, D., HAYES, J., UNDERWOOD, R., HENSON, M., RENNICH, K., SPLEEN, A., ANDREE, M., SNYDER, R., LEE, K., ROCCASECCA, K., WILSON, M., WILKES, J., LENGERICHE, E. and PETTIS, J. S. (2012). A national survey of managed honey bee 2010-11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *Journal of Apicultural Research*, **51**, 115-124.
- VANENGELSDORP, D., EVANS, J. D., SAEGERMAN, C., MULLIN, C., HAUBRUGE, E., NGUYEN, B. K., FRAZIER, M., FRAZIER, J., COX-FOSTER, D., CHEN, Y., UNDERWOOD, R., TARPY, D. R. and PETTIS, J. S. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One*, **4**, e6481.
- VANENGELSDORP, D. and MEIXNER, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol*, **103 Suppl 1**, S80-95.
- VAVRA, J. (1976b). The development of microsporidia. In: *Biology of the microsporidia*, edited by L.A. B. and T.C.C., **Plenum Press, New York**, 87-110.
- VAVRA, J. (1976a). Structure of the microsporidia. In: *Biology of the microsporidia*, edited by L.A. B. and T.C.C., **Plenum Press, New York**, 1-86.
- VAVRA, J., BEDRNIK, P. and CINATL, J. (1972). Isolation and in vitro cultivation of the mammalian microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol (Praha)*, **19**, 349-354.
- VAVRA, J. and LARSSON, J. I. R. (1999). Structure of the Microsporidia. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis*, Wittner, M. and Weiss ASM press, Washington, DC., 7-84.
- VERHAGEN, A. M., COULSON, E. J. and VAUX, D. L. (2001). Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol*, **2**, REVIEWS3009.

- VIDAU, C., DIOGON, M., AUFAUVRE, J., FONTBONNE, R., VIGUES, B., BRUNET, J. L., TEXIER, C., BIRON, D. G., BLOT, N., EL ALAOU, H., BELZUNCES, L. P. and DELBAC, F. (2011). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One*, **6**, e21550.
- VILLEMANT, C., HAXAIRE, J. and STREITO, J. C. (2006). Premier bilan de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera: Vespidae). *Bulletin de la société entomologique de France*, **111**.
- VISVESVARA, G. S., LEITCH, G. J., DA SILVA, A. J., CROPPO, G. P., MOURA, H., WALLACE, S., SLEMENDA, S. B., SCHWARTZ, D. A., MOSS, D., BRYAN, R. T. and *ET AL.* (1994). Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *J Clin Microbiol*, **32**, 2760-2768.
- VIVARES, C. P. and METENIER, G. (2001). The microsporidian *Encephalitozoon*. *Bioessays*, **23**, 194-202.
- VIZOSO, D. B. and EBERT, D. (2005). Mixed inoculations of a microsporidian parasite with horizontal and vertical infections. *Oecologia*, **143**, 157-166.
- VOJVODIC, S., JENSEN, A. B., JAMES, R. R., BOOMSMA, J. J. and EILENBERG, J. (2011). Temperature dependent virulence of obligate and facultative fungal pathogens of honeybee brood. *Vet Microbiol*, **149**, 200-205.
- VOSSBRINCK, C. R., ANDREADIS, T. G., VAVRA, J. and BECNEL, J. J. (2004). Molecular phylogeny and evolution of mosquito parasitic Microsporidia (Microsporidia: Amblyosporidae). *J Eukaryot Microbiol*, **51**, 88-95.
- VOSSBRINCK, C. R. and DEBRUNNER-VOSSBRINCK, B. A. (2005). Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitol (Praha)*, **52**, 131-142; discussion 130.
- VOSSBRINCK, C. R., MADDOX, J. V., FRIEDMAN, S., DEBRUNNER-VOSSBRINCK, B. A. and WOESE, C. R. (1987). Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*, **326**, 411-414.
- VOSSBRINCK, C. R. and WOESE, C. R. (1986). Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature*, **320**, 287-288.
- WADMAN, M. W., DE VRIES, R. P., KALKHOVE, S. I., VELDINK, G. A. and VLIEGENTHART, J. F. (2009). Characterization of oxylipins and dioxygenase genes in the asexual fungus *Aspergillus niger*. *BMC Microbiol*, **9**, 59.
- WANG, J. Y., CHAMBON, C., LU, C. D., HUANG, K. W., VIVARES, C. P. and TEXIER, C. (2007). A proteomic-based approach for the characterization of some major structural proteins involved in host-parasite relationships from the silkworm parasite *Nosema bombycis* (Microsporidia). *Proteomics*, **7**, 1461-1472.
- WANG, L. L., CHEN, K. P., ZHANG, Z., YAO, Q., GAO, G. T. and ZHAO, Y. (2006). Phylogenetic analysis of *Nosema antheraeae* (Microsporidia) isolated from Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *J Eukaryot Microbiol*, **53**, 310-313.
- WEBER, R., BRYAN, R. T., SCHWARTZ, D. A. and OWEN, R. L. (1994). Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev*, **7**.
- WEBSTER, T. C., POMPER, K. W., HUNT, G., THACKER, E. M. and JONES, S. C. (2004). *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. *Apidologie*, **35**, 49-54.
- WEIDNER, E., BYRD, W., SCARBOROUGH, A., PLESHINGER, J. and SIBLEY, D. (1984). Microsporidian spore discharge and the transfert of polaroplast organelle membrane into plasma membrane. *J. Protozool*, **31**, 195-198.
- WIEST, L., BULETE, A., GIROUD, B., FRATTA, C., AMIC, S., LAMBERT, O., POULIQUEN, H. and ARNAUDGUILHEM, C. (2011). Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*, **1218**, 5743-5756.
- WILKINSON, T. J., ROCK, J., WHITELEY, N. M., OVCHARENKO, M. O. and IRONSIDE, J. E. (2011). Genetic diversity of the feminising microsporidian parasite *Dictyocoela*: new insights into host-specificity, sex and phylogeography. *Int J Parasitol*, **41**, 959-966.
- WILLIAMS, B. A., HIRT, R. P., LUCOCQ, J. M. and EMBLEY, T. M. (2002). A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature*, **418**, 865-869.

- WILLIAMS, G. R., SHAFER, A. B., ROGERS, R. E., SHUTLER, D. and STEWART, D. T. (2008). First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *J Invertebr Pathol*, **97**, 189-192.
- WILLIAMS, I. H. (1994). The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agricultural Zoology Reviews*, **6**, 229-257.
- WINSTON, M. L. (1987). The biology of the honey bee. *Harvard University Press, Cambridge*, 281pp.
- WITTNER, M. and WEISS, L. M. (1999). The microsporidia and microsporidiosis. *Washington (D. C.) ASM Press*, 553p.
- WOESE, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, **51**, 221-271.
- WRIGHT, J. H. and CRAIGHEAD, E. M. (1922). Infectious motor paralysis in young rabbits. *J. Exp. Med.*, **36**, 135-140.
- WU, Z., LI, Y., PAN, G., TAN, X., HU, J., ZHOU, Z. and XIANG, Z. (2008). Proteomic analysis of spore wall proteins and identification of two spore wall proteins from *Nosema bombycis* (Microsporidia). *Proteomics*, **8**, 2447-2461.
- WU, Z., LI, Y., PAN, G., ZHOU, Z. and XIANG, Z. (2009). SWP25, a novel protein associated with the *Nosema bombycis* endospore. *J Eukaryot Microbiol*, **56**, 113-118.
- XIAO, L., LI, L., MOURA, H., SULAIMAN, I., LAL, A. A., GATTI, S., SCAGLIA, M., DIDIER, E. S. and VISVESVARA, G. S. (2001a). Genotyping *Encephalitozoon hellem* isolates by analysis of the polar tube protein gene. *J Clin Microbiol*, **39**, 2191-2196.
- YANG, Z. and BIELAWSKI, J. P. (2000). Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol Evol*, **15**, 496-503.
- YEATS, C., BENTLEY, S. and BATEMAN, A. (2003). New knowledge from old: in silico discovery of novel protein domains in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Microbiol*, **3**, 3.
- ZANDER, E. (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung*, **31**, 196-204.
- ZHANG, H., HUANG, H., CALI, A., TAKVORIAN, P. M., FENG, X., ZHOU, G. and WEISS, L. M. (2005). Investigations into microsporidian methionine aminopeptidase type 2: a therapeutic target for microsporidiosis. *Folia Parasitol (Praha)*, **52**, 182-192.
- ZHANG, Z. and HENZEL, W. J. (2004). Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. *Protein Sci*, **13**, 2819-2824.
- ZHENG, D., ALM, E. W., STAHL, D. A. and RASKIN, L. (1996). Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 4504-4513.

ANNEXES

Annexes

Souches bactériennes utilisées dans ce travail

| Souche | Génotype |
|----------------------|--|
| DH5α | <i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> |
| BL21 (DE3) | <i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3)</i> |
| BL21 Star (DE3) | <i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm rne131 (DE3)</i> |
| BL21 Star | <i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm rne131</i> |
| BLR (DE3) | <i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) Δ(srl-recA)306::Tn10 (Tet^R)</i> |
| Novablue (DE3) | <i>endA1 hsdR17(r_{K12}⁻m_{K12}⁻) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac (DE3) F'[proA⁺B⁺ lacI^qΔ Z M15::Tn10] (Tet^R)</i> |
| Rosetta 2(DE3) | <i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3)</i> |
| + pLysSRARE2 | + pLysSRARE2 : p15A origin, <i>lysS, cat, argN5, argU, argW, argX, glyT, ileX, leuW, metT, proL, thrT, thrU, tyrU</i> (Cam ^R) |
| Rosetta-gami 2 (DE3) | <i>Δara-leu7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3)</i> |
| + pLysSRARE2 | <i>F'[lac⁺ lacIq pro] gor522::Tn10 trxB (Str^R, Tet^R)</i> + pLysSRARE2 : p15A origin, <i>lysS, cat, argN5, argU, argW, argX, glyT, ileX, leuW, metT, proL, thrT, thrU, tyrU</i> (Cam ^R) |
| Origami B (DE3) | <i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB (Kan^R, Tet^R)</i> |

New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on *multilocus* sequence analysis

MATHIEU ROUDEL^{1,2}, JULIE AUFAUVRE^{1,2}, BRUNO CORBARA^{1,2},
FREDERIC DELBAC^{1,2} and NICOLAS BLOT^{1,2*}

¹ Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire 'Microorganismes : Génome et Environnement', BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

² CNRS, UMR 6023, LMGE, 63171 Aubière, France

(Received 25 February 2013; revised 23 May and 7 June 2013; accepted 8 June 2013; first published online 23 July 2013)

SUMMARY

The microsporidian parasite *Nosema ceranae* is a common pathogen of the Western honeybee (*Apis mellifera*) whose variable virulence could be related to its genetic polymorphism and/or its polyphenism responding to environmental cues. Since the genotyping of *N. ceranae* based on unique marker sequences had been unsuccessful, we tested whether a *multilocus* approach, assessing the diversity of ten genetic markers – encoding nine proteins and the small ribosomal RNA subunit – allowed the discrimination between *N. ceranae* variants isolated from single *A. mellifera* individuals in four distant locations. High nucleotide diversity and allele content were observed for all genes. Most importantly, the diversity was mainly present within parasite populations isolated from single honeybee individuals. In contrast the absence of isolate differentiation precluded any *taxa* discrimination, even through a *multilocus* approach, but suggested that similar populations of parasites seem to infect honeybees in distant locations. As statistical evolutionary analyses showed that the allele frequency is under selective pressure, we discuss the origin and consequences of *N. ceranae* heterozygosity in a single host and lack of population divergence in the context of the parasite natural and evolutionary history.

Key words: *Nosema ceranae*, parasite, honeybee, diversity.

INTRODUCTION

Nosema spp. are obligate intracellular parasites belonging to Microsporidia, a cosmopolitan phylum derived as a basic branch of the fungi (Keeling and Fast, 2002; Capella-Gutiérrez *et al.* 2012). Microsporidia are characterized by the production of resistant spores carrying a polar tube, used to transfer the infectious sporal content into target cells, and by their 70S ribosomes with bacterial-sized rRNAs. The genus *Nosema* comprises more than 150 species that mainly infect invertebrate hosts (Becnel and Andreadis, 1999). The western honeybee (*Apis mellifera*) is parasitized by the long-known *Nosema apis* (Zander, 1909) and by the emerging *Nosema ceranae*. Both are the etiologic agents of nosemosis, one of the most widespread diseases of the honeybee. *Nosema ceranae* is thought to have jumped host from the Asian (*Apis cerana*) to the Western honeybee some decades ago and has now become the predominant microsporidian species infecting *A. mellifera* (Klee *et al.* 2007; Chen *et al.* 2008; Martin-Hernandez *et al.* 2012). *Nosema ceranae* has also been reported in other oriental *Apis* and *Bombus* species (Plischuk *et al.* 2009; Chaimanee *et al.* 2010, 2011; Li *et al.* 2012).

The documented *A. mellifera* colony losses observed for the last 15 years has become an alarming issue for the beekeeping and agricultural fields as well as for conservation biology, especially due to the pollinating activity of the honeybees (Potts *et al.* 2010). Although the origin of the honeybee decline has not been clearly identified and is thought to be multicausal, some studies have suggested a role of *N. ceranae* (Martin-Hernandez *et al.* 2007; Higes *et al.* 2008, 2010). Following the ingestion of spores, the parasites invade and develop within the cytoplasm of the epithelial cells of the adult honeybee midgut. *N. ceranae* is considered as a major threat to the Western honeybee at both the individual and colony levels (Fries, 2010; Higes *et al.* 2013). It would increase the honeybee mortality, activate the degeneration of the infected cells, induce an energetic stress and inhibit transcripts involved in immunity (Antúnez *et al.* 2009; Martin-Hernandez *et al.* 2011; Dussaubat *et al.* 2012; Chaimanee *et al.* 2012). However the presence of *N. ceranae* is not systematically associated with honeybee weakening and mortality (Cox-Foster *et al.* 2007; Invernizzi *et al.* 2009; Gisder *et al.* 2010), suggesting modulations in the parasite virulence. Thus, not only the role of *N. ceranae* in the honeybee decline but also the origin of the variation in its virulence remains elusive. Some authors have suggested that such variation could be related to a polymorphism between *N. ceranae* isolates (Fries, 2010; Higes *et al.* 2013),

* Corresponding author: Université Blaise Pascal, Laboratoire 'Microorganismes: Génome et Environnement' CNRS UMR 6023, 63177 Aubière, France. E-mail: nicolas.blot@univ-bpclermont.fr

meaning that different parasite variants may infect the honeybee, some of them inducing a higher virulence.

Although the genome of the BRL01 strain of *N. ceranae* has been sequenced (Cornman *et al.* 2009), data are lacking regarding the comparison of the gene content between *N. ceranae* isolates and the assessment of *N. ceranae* genetic polymorphism *sensu stricto*, i.e. its genetically determined pathogenicity. Several studies have sought to evaluate the parasite genetic polymorphism *sensu lato*, i.e. the nucleotide variation in sequences that appeared relevant for the genotyping of strains in other microsporidia, but failed to discriminate between *N. ceranae* isolates. The nucleotide diversity of the ribosomal RNA coding region (rDNA) successfully discriminated between isolates of the mammals' microsporidian parasites *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* and *Enterocytozoon bieneusi* (Didier *et al.* 1995; Mathis *et al.* 1999; Haro *et al.* 2003; ten Hove *et al.* 2009) but not of *N. ceranae* sampled in *A. mellifera* (Huang *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009a; Sagastume *et al.* 2011). The rDNA diversity observed in *N. ceranae* and the bumblebees' parasite *Nosema bombi* (Tay *et al.* 2005; O'Mahony *et al.* 2007; Sagastume *et al.* 2011) have suggested that rDNA may escape the concerted evolution maintaining sequence identity between the multiple gene copies present within *Nosema* genomes and would consequently be inappropriate to phylogenetic analyses (Ironside, 2007; Fries, 2010). The nucleotide diversity of virulence-related genes encoding Polar Tube Proteins (PTPs) and Spore Wall Proteins (SWPs) has allowed determining variants of *E. cuniculi* and *E. hellem* (Peuvel *et al.* 2000; Haro *et al.* 2003; Polonais *et al.* 2010). However, neither PTP1 nor PTP3 encoding genes permitted the distinction of *N. ceranae* isolates (Chaimanee *et al.* 2011; Hatjina *et al.* 2011). Since the polymorphism of rDNA and PTP3 genes seems to be a major obstacle for genotyping (Hatjina *et al.* 2011; Sagastume *et al.* 2011) one may wonder if the use of several independent gene markers may resolve parasite taxa.

In order to assess whether *N. ceranae* isolates can be discriminated through a *multilocus* approach, we compared the nucleotide and haplotype diversity of ten *N. ceranae* genes, including the small-subunit ribosomal RNA (SSU-rDNA) gene and nine protein encoding genes, that appeared both within and between parasite populations isolated from four geographically distant honeybees.

MATERIALS AND METHODS

Honeybee sampling

Apis mellifera individuals were collected in France, Morocco, Lebanon and Thailand in 2010 and 2011. The presence of microsporidian parasites has been

verified by both the microscopic observation of spores and the amplification of the microsporidian SSU-rDNA using the Nc_D1 (CGACGATGTGATATGAAAATATTTAA) and Nc_R1 (TCATTCTCAAACAAAAAACCGTTC) primers. The absence of *N. apis* was checked using the Na_D1 (GCATGTCTTTGACGTACTATGTAC) and Na_R1 (CGTTTAAAATGTGAAACAACATG) primers. All primers derived from Martin-Hernandez *et al.* (2007). The isolate concept was defined here as the parasite population infecting a single individual, thus only one bee from each location was used for subsequent cloning.

Genetic markers amplification and cloning

Ten genetic markers have been amplified by PCR (Platinum *Taq* Polymerase High Fidelity, Invitrogen) in a mixture containing 2 mM MgSO₄ and 0.4 µM of each primer (Table 1) in a total volume of 25 µL, and performing annealing steps at 52 °C. PCR products were inserted into the pCRII-TOPO cloning vector (TOPO TA Cloning Kit Dual Promoter, Invitrogen). After transformation (NEB 5-alpha cells, New England Biolabs), several clones were cultured and their plasmids content extracted. Inserted fragments were sequenced (GATC Biotech, Germany) using both the T7 and M13 Reverse flanking primers. To check the absence of experimentally induced sequence variation, a control has been performed using a clonal plasmid preparation carrying the SWP30 marker as an initial PCR template.

Statistical evolutionary analyses

To determine variable sites, nucleotide sequences were aligned using ClustalW under the BioEdit editor (Hall, 1999), selecting the amplified fragments only, i.e. removing primer sequences. All polymorphic sites were visually checked for quality on electropherograms. Alignments with insertions-deletions (*indels*) of tandem repeats were manually improved for better parsimony. Diversity, transition to transversion and $d_N:d_S$ analyses were conducted in MEGA5, removing ambiguous positions in pairwise comparisons (pairwise deletion) allowing to consider *indels* as polymorphic characters (Nei and Kumar, 2000; Tamura *et al.* 2011). The nucleotide diversity has been given by averaging the pairwise p -distances between sequences, i.e. the mean number of base differences per site, for the whole allelic population (π) and for populations within (π_w) or between (π_b) honeybee isolates. To measure how isolates subpopulations differed, the nucleotide diversity explained by population structure and the magnitude of gene differentiation among subpopulations were given by the fixation index (F_{ST}) and the coefficient of evolutionary differentiation (G_{ST}), respectively.

Table 1. Marker genes and primers used for genetic variability ^(a) and RT-PCR ^(b) analyses

| ORF name in <i>N. ceranae</i> BRL01 genome | Forward and reverse primers (5' to 3') | References |
|---|--|--|
| SSU-rDNA (DQ486027) | MICRO-F2 CACCAGGTTGATTCTGCCTG ^{a,b} | From Visvesvara <i>et al.</i> (1995) |
| EnP1B (NCER_100768) | Univ-1390 GACGGGCGGTGTGTACAA ^{a,b} EnP1B-F GCATTTTGTATTTGGGTGG ^{a,b} EnP1B-R ACCAGCAGGTCTGCAATC ^{a,b} | Zheng <i>et al.</i> (1996) This study |
| PTP2 (NCER_101590) | PTP2-F GTAGCCAAGTTGCCACCT ^{a,b} PTP2-R GGGTTCTGCATCCTTGTCT ^{a,b} | This study |
| HSWP4 (NCER_100828) | SWP4-F CATGAACCTTAAGGGATTAGCAAG ^{a,b} SWP4-R CTCTTCGTGTGCATCATCCG ^{a,b} | This study |
| SWP25 (NCER_100064) | SWP25-F GGTTTATGTAGCATTTGAGGATGC ^{a,b} SWP25-R TGCTGGCATAAAGTTCCATC ^{a,b} | This study |
| SWP30 (NCER_100566) | SWP30-F ATGCGGGAATATGAACATCC ^{a,b} SWP30-R CTTTAACAACCTGTGTTCTTTTCGTAC ^{a,b} | This study |
| NCER_100070 | NCER_100070-F GCCGGCAACAAAACCTATC ^a NCER_100070-R CGTTACTGGCATCACTGTTGG ^a | This study |
| | NCER_100070_midF AGGAGGACTCTTCGATCAC ^b NCER_100070_midR TCATCCTGCGGTTTATTATTGG ^b | This study |
| NCER_100533 | NCER_100533-F GAATTGGGATTTGGAGGAGG ^a NCER_100533-R TCTGAAGGGTCGGGTGAAG ^a | This study |
| | NCER_100533_endF CCGAGGGTCAACAAAATGAC ^b NCER_100533_endR ACATTCCCTGTGGCAAACTC ^b | This study |
| NCER_101600 | NCER_101600-F GCCTATGACTTCATTACAAGAAGAATC ^{a,b} NCER_101600-R TCACTCGTAAGTTTCGCATTTG ^{a,b} | This study |
| NCER_101165 | NCER_101165-F AATCCGCTAACTCGACCTTC ^a NCER_101165-R GAGATTTTCGGGTTCGACAATG ^a | This study |
| | NCER_101165_endF TCGACCCGAAATCTCAACTC ^b NCER_101165_endR GTGTGCCTTCATCATCATCG ^b | This study |

Standard error estimates were obtained by a bootstrap procedure with 10 000 replicates. The overall transition/transversion bias ($R_{s/v}$) was computed from the Maximum Composite Likelihood estimate of the pattern of nucleotide substitution. The codon-based one-tailed test of selection has been performed by calculating the probability of rejecting the null hypothesis of strict-neutrality ($d_N = d_S$) in favour of the alternative hypotheses, $d_N < d_S$ or $d_N > d_S$ for purifying or positive selection respectively, using the Li–Wu–Luo method. Statistical significance (P -values < 0.05 were considered significant) was computed by a 10 000-replicates bootstrap resampling procedure. All tests were in favour of $d_N < d_S$ rather than $d_N > d_S$.

Other selection neutrality tests, linkage disequilibrium (LD) and recombination analyses were conducted in DnaSP (Librado and Rozas, 2009; Rozas, 2009) removing all positions containing gaps and missing data (complete deletion). Divergence from the null hypothesis, i.e. from the hypothesis that all mutation are either neutral or strongly deleterious, was estimated computing the Tajima's D (Tajima, 1989) and Ramos-Onsins & Rozas's R_2 (Ramos-Onsins and Rozas, 2002), based on the nucleotide polymorphism, and the Fu's F_s (Fu, 1997), based on the haplotype distribution. The LD, i.e. the non-random association of alleles, was estimated by calculating ZZ , which equals the average LD between adjacent polymorphic sites minus the standardized

average intragenic LD (Rozas *et al.* 2001). Statistical significance (P -values < 0.05 were considered significant) was given by the probability of obtaining under the null hypothesis absolute values equal or higher than the observed ones. It was computed by performing coalescent simulation with 10 000 replicates using fixed theta per sequence values and no recombination, no strong difference being observed using a recombination parameter. All significant values were out of the confidence interval comprising 95% of the expected values under the null hypothesis (data not shown), i.e. they were very unlikely under the standard neutral model. The number of pairs of polymorphic sites that exhibit statistically significant LD ($P < 0.05$) performing a two-tailed Fisher's exact test, with and without Bonferroni correction against multiple comparisons biases, is given together with the total amount of considered pairwise comparisons.

Phylogenetic trees were computed under MEGA 5, using the Maximum Likelihood algorithm, with a 10 000-replicates bootstrap procedure, a nucleotide substitution model using the Tamura 3-parameters method and a Nearest-Neighbour-Interchange heuristic method.

Sequence prediction and modelling

Prediction of potentially secreted proteins was based on the screening for potential N-terminal secretory signal sequences using SignalP v3.0 (Bendtsen *et al.*

2004). Peptide repeated motifs in EnP1B and NCER_101600 were manually extracted and schematized using the WebLogo tool (Crooks *et al.* 2004).

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted from the midgut of one naturally infected honeybee in France (SV total RNA Isolation System Kit, Promega). cDNA was synthesized (ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega) using an oligo-d(T) primer (Invitrogen) and 100 ng of RNA. Subsequent PCR amplifications were performed (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega) using the RT-PCR primers listed in Table 1. Negative and positive controls were performed using reactions without the reverse transcriptase and *N. ceranae* genomic DNA as a template respectively. All controls validated the experiment.

RESULTS

Selection of *N. ceranae* marker genes

Ten marker genes have been selected within the *N. ceranae* BRL01 genome (Cornman *et al.* 2009), including the nearly complete rRNA small subunit encoding gene. Four spore wall and polar tube protein encoding genes have been identified and named according to their closest known homologues in *Nosema bombycis* (Table 1). They encode the polar tube protein PTP2, the spore wall proteins SWP25 and SWP30, and the hypothetical spore wall protein HSWP4 (Wu *et al.* 2008, 2009). Except for its first 32 codons, the NCER_100768 gene encodes a protein homologous to the spore wall protein EnP1 of *Encephalitozoon cuniculi* (Peuvel-Fanget *et al.* 2006). We propose to shift the start codon from the suggested GTG to the first upstream ATG codon and to name the resulting open reading frame EnP1B, as another gene (NCER_101082) with higher homology with *E. cuniculi* EnP1 is already present in *N. ceranae* genome. Lastly, four genes encoding hypothetical proteins carrying tandem peptide repeats and potential N-terminus secretion signal were selected as potential surface and/or structural proteins that could show high variability. RT-PCR experiments (data not shown) proved that all the chosen open reading frames are transcribed in a naturally *N. ceranae*-infected honeybee, demonstrating that they are true protein-encoding genes that ought to be subjected to evolutionary processes.

Within- vs between-isolate distance of *N. ceranae* marker genes

Following amplification and cloning, 8–15 clone sequences were obtained for each marker and each isolate and have been deposited in GenBank (Accession Numbers KC680230 to KC680656). The experimental control performed using a clonal matrix

did not show any sequence variation in the 15 obtained clones, showing that no error-prone bias was brought throughout the procedure, i.e. any sequence diversity observed ought to depict true allelic variability. Whatever the tested marker, a surprisingly high allele content – mostly due to singletons – has been observed, even for populations isolated from single host individuals (Table 2). In order to compare the genetic variability of the markers, pairwise *p*-distances between sequences have been averaged to the nucleotide diversities present in the whole allelic population (π), within a single honeybee (π_w) and between geographically distant honeybees (π_b , Table 2 and Fig. 1). For each marker, the π_w and π_b were very similar, showing that there is as much variability within a single bee as between geographically distant bees. Even *p*-distance maxima were very similar within and between isolates (Fig. 1), showing that the most divergent sequences can be found within a single parasitized individual. Moreover, whatever the marker, the minimum *p*-distances were null both within and between isolates, showing that there are always identical alleles within an isolate but also between distant isolates. Altogether, these data suggest that the parasite populations infecting honeybees were similar in the four locations studied. Indeed, the F_{ST} and G_{ST} indices for population differentiation between isolates were low (Table 2), indicating that the parasite populations from distinct isolates are poorly divergent.

The nucleotide diversity appeared variable between markers, with π ranging from 0.001 to 0.018 for HSWP4 and EnP1B respectively (Fig. 1). However, these values are still too low, and especially much lower than their corresponding π_w , to differentiate the isolate populations. Indeed phylogenetic analyses failed to separate isolate-specific taxa: whatever the chosen marker and the evolutionary model, trees had star-like topologies with poorly supported nodes by bootstrap procedures (Fig. 2). Altogether, these data suggested that the markers high nucleotide diversity but low divergence between isolates preclude any *multilocus* approach for the genotyping of *N. ceranae* strains.

Nature of polymorphic characters

The high transition to transversion bias observed for all markers suggests that they are submitted to evolutionary processes including selection. Indeed all markers exhibited rejection of at least one neutrality test (shown in bold in Table 2). For most protein encoding genes, the codon-based one-tailed test of selection significantly rejected the null hypothesis in favour of the purifying hypothesis ($d_N < d_S$). However, four markers also exhibited nonsense mutations, leading to the encoding of non-functional proteins, suggesting that the markers may be submitted to complex evolutionary processes. EnP1B

Table 2. Statistics of nucleotide polymorphism, divergence, linkage disequilibrium and recombination in ten gene regions of *N. ceranae*

| Marker | SSU-rDNA | EnPIB | PTP2 | HSWP4 | SWP25 | SWP30 | NCER_100070 | NCER_100533 | NCER_101600 | NCER_101165 |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---|---------------------|
| Length of analysed sequence | 1116 bp | 732 bp | 474 bp | 650 bp | 655 bp | 537 bp | 698 bp | 671 bp | 902 bp | 660 bp |
| Nb of sequences | 39 | 41 | 44 | 42 | 39 | 42 | 40 | 37 | 59 | 44 |
| Nb of alleles | 37 | 33 | 22 | 13 | 20 | 25 | 22 | 14 | 27 | 25 |
| Variable sites | 66 | 56 | 26 | 14 | 23 | 35 | 23 | 18 | 48 | 31 |
| Unique variable sites | 55 | 24 | 22 | 14 | 22 | 28 | 16 | 17 | 31 | 24 |
| Size (and number) of <i>indels</i> | 1(x6)1, 2, 4 | 21(x2), 24, 45, 87 | — | — | — | — | 1(x4), 3 | 1, 36, 144 | 1, 60, 85, 108, 114, 150, 216, 228, 444 | — |
| Entire population nucleotide diversity, π | 0.00446 ± 0.00081 | 0.01782 ± 0.00283 | 0.00503 ± 0.00154 | 0.00102 ± 0.00026 | 0.00231 ± 0.00067 | 0.00766 ± 0.00199 | 0.00635 ± 0.00194 | 0.00155 ± 0.00036 | 0.00716 ± 0.00161 | 0.00695 ± 0.00193 |
| Within isolate mean p-distance, π_w | 0.00454 ± 0.00083 | 0.01468 ± 0.00245 | 0.00470 ± 0.00140 | 0.00094 ± 0.00024 | 0.00209 ± 0.00051 | 0.00779 ± 0.00206 | 0.00513 ± 0.00149 | 0.00157 ± 0.00037 | 0.00737 ± 0.00162 | 0.00515 ± 0.00133 |
| Between isolate mean p-distance, π_b | 0.00453 ± 0.00092 | 0.01723 ± 0.00306 | 0.00495 ± 0.00162 | 0.00095 ± 0.00033 | 0.00233 ± 0.00083 | 0.00765 ± 0.00206 | 0.00664 ± 0.00207 | 0.00157 ± 0.00052 | 0.00725 ± 0.00161 | 0.00744 ± 0.00217 |
| Mean interpopulation diversity, F_{ST} | — 0.00008 ± 0.00008 | 0.00204 ± 0.00044 | 0.00031 ± 0.00022 | 0.00008 ± 0.00004 | 0.00023 ± 0.00022 | — 0.00010 ± 0.00015 | 0.00118 ± 0.00004 | — 0.00001 ± 0.00006 | — 0.00021 ± 0.00010 | 0.00180 ± 0.00067 |
| Isolate differentiation coefficient, G_{ST} | — 0.02 ± 0.02 | 0.12 ± 0.02 | 0.06 ± 0.03 | 0.08 ± 0.03 | 0.10 ± 0.07 | — 0.01 ± 0.02 | 0.19 ± 0.03 | — 0.01 ± 0.04 | — 0.03 ± 0.01 | 0.26 ± 0.04 |
| Mean pairwise transition to transversion ratio, s/v | 2.86 ± 0.69 | 6.01 ± 2.29 | 2.14 ± 0.92 | 0.31 ± 0.15 | 1.53 ± 0.79 | 3.92 ± 1.47 | 5.17 ± 2.21 | ND (only transitions) | 3.86 ± 2.06 | 2.77 ± 2.16 |
| Overall transition to transversion bias, R_{ST} | 4.10 | 5.46 | 3.63 | 13.02 | 8.93 | 6.86 | 4.81 | 345.8 | 4.70 | 3.56 |
| Nb of synonymous, missense, nonsense SNPs | — | 29, 26, 1 | 7, 19, 0 | 6, 8, 0 | 10, 12, 1 | 13, 21, 0 | 6, 17, 0 | 13, 4, 1 | 23, 25, 0 | 13, 17, 1 |
| Rejection of $d_N = d_S$ in favour of $d_N < d_S$ or $d_N > d_S$ (p) | — | $d_N < d_S$ (0.000) | $d_N < d_S$ (0.101) | $d_N < d_S$ (0.049) | $d_N < d_S$ (0.055) | $d_N < d_S$ (0.025) | $d_N < d_S$ (0.340) | $d_N < d_S$ (0.001) | $d_N < d_S$ (0.001) | $d_N < d_S$ (0.071) |
| Tajima's D (p) | — 2.45 (0.000) | — 0.36 (0.400) | — 2.07 (0.002) | — 2.49 (0.000) | — 2.43 (0.000) | — 1.70 (0.022) | — 0.55 (0.339) | — 2.43 (0.000) | — 0.94 (0.186) | — 1.28 (0.094) |
| Fu's F_S (p) | — 36.36 (0.000) | — 17.18 (0.000) | — 17.54 (0.000) | — 12.40 (0.000) | — 21.22 (0.000) | — 15.77 (0.000) | — 6.73 (0.009) | — 9.36 (0.000) | — 2.41 (0.182) | — 13.58 (0.000) |
| Ramos-Onsins and Rozas's R_2 (p) | 0.030 (0.000) | 0.093 (0.314) | 0.038 (0.000) | 0.043 (0.000) | 0.030 (0.000) | 0.047 (0.004) | 0.085 (0.225) | 0.051 (0.000) | 0.079 (0.251) | 0.061 (0.042) |
| Haplotype diversity (expected heterozygosity), Hd (p) | 0.985 (0.999) | 0.974 (0.999) | 0.918 (0.999) | 0.460 (0.531) | 0.849 (0.982) | 0.928 (0.990) | 0.845 (0.567) | 0.511 (0.522) | 0.617 (0.105) | 0.920 (0.822) |
| Intragenic recombination, ZZ (p) | 0.052 (0.822) | 0.062 (0.926) | — 0.023 (0.395) | — 0.033 (0.208) | — 0.017 (0.382) | 0.002 (0.559) | 0.019 (0.657) | 0.022 (0.738) | 0.201 (0.996) | 0.096 (0.946) |
| Polymorphic pairs with significant LD w_i, w_j , correction (total pairs) | 69.0 (2016) | 104.29 (903) | 9.1 (300) | 3.0 (91) | 4.0 (253) | 25.5 (595) | 23.21 (231) | 5.0 (91) | 45.27 (171) | 22.10 (435) |
| Minimum number of recombination events (R_m) | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 4 | 1 |

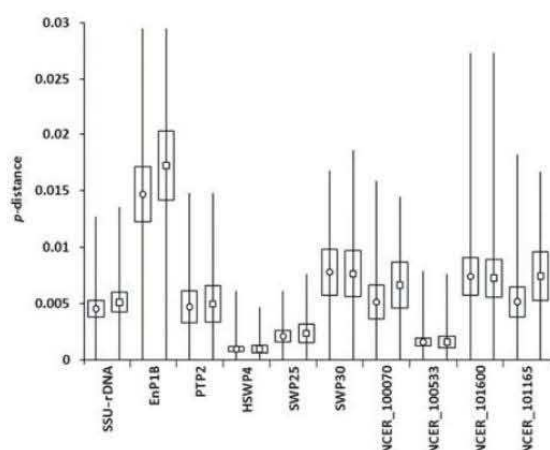


Fig. 1. Nucleotide diversity of ten *N. ceranae* genes. The nucleotide diversity is represented as the mean p -distance (i.e. the number of base differences per site) between sequences within an isolate (π_w , circles) and between isolates (π_b , squares). Standard error estimates obtained by a 10 000-replicates bootstrap procedure are shown by boxes. Lines represent the complete range of pairwise p -distances, showing the minimum and maximum obtained values.

and NCER_101600 showed large *indel* events corresponding to discrete numbers of base triplets thus not inducing frameshift. For EnP1B, *indels* were linked to a difference in the repetition of a 7-amino acid motif (Figs 3 and 4). A more complex pattern could be highlighted for the *indels* observed in NCER_101600, which contained two close but distinct 14- or 16-amino acid repeated motifs (Fig. 4). These *indels*, up to 444 base pairs (bp), generated a large variation in the length of NCER_101600 amplified products. Although they were not present in all isolates in our dataset, the dominant amplification products at 573, 801 and 951 bp were visible by agarose gel electrophoresis for all isolates (data not shown).

Among the segregating sites observed in the SSU-rDNA in the present and other deposited data, most were single nucleotide polymorphisms (SNPs), 70.8 and 16.7% being transitions and transversions respectively, but 12.5% of the sites showed *indel* events. The variable sites have been located on a proposed secondary structure model of the corresponding RNA subunit (Supplementary Fig. S1 – in Online version only). Helices were less submitted to variability than non-helix domains and most of the mutations in helices did not strongly modify the base pairing of the structure, i.e. changing a canonical (or non-canonical) bond to another one, suggesting non-random mutagenic events.

DISCUSSION

The variability of *N. ceranae* gene sequences

Since one gene itself does not allow assessing the diversity of *N. ceranae* parasites in *A. mellifera*,

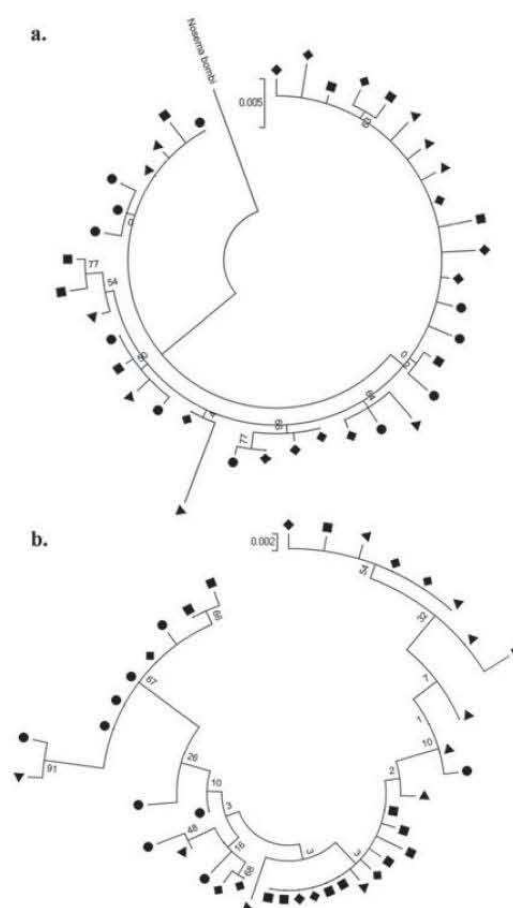


Fig. 2. Phylogenetic analysis of the *N. ceranae* small ribosomal RNA subunit (a) and hypothetical spore wall protein EnP1B (b) encoding genes from four geographically distant locations. The evolutionary history analysis was inferred by the maximum likelihood method using the multiple sequences obtained from four individuals sampled in France, Lebanon, Morocco and Thailand (indicated by triangle, star, square and circle respectively). The first tree was rooted using the close *Nosema bombi* SSU sequence as an outgroup while the second tree was unrooted since no close homologue of EnP1B was found in databases. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together, inferred by a 10 000-replicates bootstrap analysis, is shown next to the branches.

we tested whether a *multilocus* approach could discriminate between populations of the parasite. This work showed that every gene presents unexpected high nucleotide diversity within a single host individual (π_w) but a poor genetic variation between parasite populations isolated from geographically distant honeybees (F_{ST} and G_{ST} , Table 2 and Fig. 1). Thus, while *N. ceranae* showed high sequence variability, the latter did not allow any discrimination between parasite variants, even using concomitantly several genetic markers, implying that any phylogenetic assertions on *N. ceranae* must be considered with care.

Fig. 3. Alignment of the partial EnPIB protein sequences inferred by the sequencing of the corresponding gene in single individuals sampled in France, Lebanon, Morocco and Thailand (as indicated by their initials on the left). The consensus sequence is indicated in the first row. Below, lines stand for identical sequences, letters for amino acid substitutions, dots for synonymous nucleotide substitutions (i.e. without change of the corresponding amino acid), blank areas for deletions. The star indicates a nonsense substitution (i.e. inducing a stop codon). Repeated motifs are separated by columns and have been numbered with Latin letters on their top.

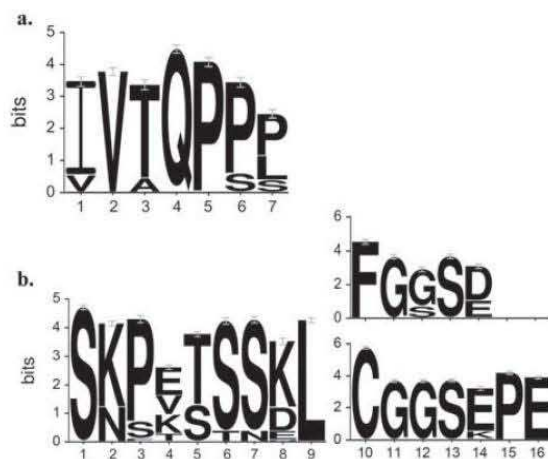


Fig. 4. Logo of the repeated motifs of EnP1B (a) and NCER_101600 (b) inferred by aligning the 264 and 678 respective peptide sequences extracted from our data. The height of each letter is proportional to the observed frequency of the corresponding amino acid and the overall height of each stack of letters is proportional to the sequence conservation at that position (with 4.32 bits as a maximum sequence conservation).

For all the tested markers, most of the alleles observed were singletons (Table 2). This low redundancy suggests that the true allelic richness was certainly underestimated. For instance not all *indels* of the NCER_101600 marker have been cloned and sequenced in every isolate whereas corresponding bands had been observed in agarose gel electrophoresis. Thus variations in nucleotide diversity between genes (Fig. 1) may be due to their intrinsic variability and allele selection as well as to a lack of data. Concerning the nucleotide diversity of the SSU-rDNA, although it seems variable in microsporidia, similar levels have been observed in the rDNA regions of *N. bombycis*, *Nosema granulosis* and *Vairimorpha cheracis* (π ranging from 0.004 to 0.009; Ironside, 2013) and a heterogeneity in rDNA sequences had also been observed in *N. apis* and *N. bombi* (Gatehouse and Malone, 1998; Tay *et al.* 2005; O'Mahony *et al.* 2007), suggesting that high nucleotide diversity might be common in the *Nosema/Vairimorpha* group.

A lack of N. ceranae population divergence between geographically distinct A. mellifera hosts

The low F_{ST} and G_{ST} indices (Table 2) indicated that no differentiation between *N. ceranae* populations could be assessed upon the geographic origin of their *A. mellifera* host. Such lack of divergence had already been observed for the rDNA marker and the genes encoding the polar tube proteins PTP1 and PTP3 (Huang *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009a; Chaimanee *et al.* 2011; Hatjina *et al.* 2011; Sagastume *et al.* 2011). Our data inferred that this can certainly be

extrapolated to any coding genes of *N. ceranae* although there are no data based on selection-free silent sites and microsatellites to enlarge this to the whole genome sequence. Moreover, our results clearly confirmed the previously suggested hypothesis that geographically distant honeybees may be infected by similar parasite populations (Huang *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009a; Sagastume *et al.* 2011).

The significant R_2 and the significantly negative Tajima's D and Fu's F_s statistics (Table 2) are characteristic of a population expansion (Ramirez-Soriano *et al.* 2008). This is particularly supported by the almost always significantly negative F_s (for all markers but NCER_101600) that is thought to be a more sensitive indicator of population expansion than D . The very weak population divergence observed through F_{ST} and G_{ST} (Table 2) and the star-like phylogenetic dendrograms (Fig. 2) suggest that such population expansion would have emerged from a poorly diverse initial population. It has been shown that the nucleotide diversity of the PTP1 gene allowed separating specific taxa of *N. ceranae* in *Apis florae* and in *Apis dorsata*, but no distinction could be found amongst parasites isolated from *Apis cerana* and *A. mellifera* (Chaimanee *et al.* 2011). Thus parasite populations may yet be discriminated relative to their host niche but a very similar population infects the Asian and the European honeybee species. Altogether, these findings support the hypothesis that *N. ceranae* experienced a recent host-jump from the Asian honeybee *A. ceranae* to the Western honeybee *A. mellifera* followed by a rapid spreading in its new host niche (Paxton *et al.* 2007; Klee *et al.* 2007; Chen *et al.* 2008; Botias *et al.* 2012) that may have been favoured by sustained inter-continental honeybee exchanges (Klee *et al.* 2007; Mutinelli, 2011). Such a host-jump may have constituted a bottleneck-like event, with a strong genetic drift followed by a rapid increase in population size. Such evolutionary history would also be reflected by negative D and F_s values and significant R_2 (Fay and Wu, 1999; Ramirez-Soriano *et al.* 2008) and by the short and weakly supported branching of the markers' evolutionary models (Fig. 2). However if most lineages did not survive the bottleneck event, a long branch would be expected between the taxonomic units related to the *A. cerana* and the *A. mellifera* hosts. This was not observed by Chaimanee *et al.* (2011), suggesting that the parasite populations infecting the former and new hosts may not have been completely isolated yet.

Origin and maintenance of the N. ceranae genetic variation

Mixed infection of one host by several parasite genotypes may affect the host-parasite interactions with benefits to the parasite infectivity and development,

as shown for the microsporidian *Octospora bayeri* in *Daphnia magna* (Vizoso and Ebert, 2005). However, in agreement with Sagastume *et al.* (2011), it is hardly conceivable that geographically distant honeybees are systematically infected by a similar non-clonal population of parasites, and that this genotype diversity is maintained throughout the parasite development. Thus the high *N. ceranae* haplotype diversity or expected heterozygosity *Hd* (Table 2), with many haplotypes per isolates, would rather be linked to a combination of non-haploid stages, recombination events and/or gene exchange.

The rDNA is present in multiple *loci* within *N. ceranae* genome (Cornman *et al.* 2009) and its nucleotide diversity could be related to an intra-genomic polymorphism of these gene copies, as observed within a single spore of *N. bombi* (O'Mahony *et al.* 2007). As the SSU-rDNA marker did not show stronger diversity than protein encoding markers (Fig. 1, Table 2), one may wonder whether all genes would be present in multiple polymorphic copies, questioning the polyploidy of the parasite. The observation of frameshift mutations, due to nonsense SNPs or 1-bp deletions, supports this hypothesis, as it would allow the accumulation of mutations in inactivated genes, leading to pseudogenization while maintaining functional allele copies under selective pressure. The observed *Hd* is not significantly different to what would be expected for a diploid organism (Table 2). *Nosema ceranae* is a dikaryotic single cell organism (Chen *et al.* 2009b) and, although the ploidy of the two nuclei is not known, *N. ceranae* could be considered to be at least diploid.

High heterozygosity with low F_{ST} could be interpreted as a clonal and asexual life cycle, with transient stages of di- or polyploidy, resulting in the same allelic population in isolates and leading to incorrect phylogenetic topology assertions (Birky, 1996; Haag *et al.* 2013). However a clonal mode of reproduction should lead to strong LD whereas the intragenic recombination given as *ZZ* values was never significant (Table 2). Yet the R_m values and the detection of polymorphic site pairs with significant LD suggest that recombinations did occur between alleles. Through meiosis, sex is a source of recombination and gene exchange, but it would have been lost independently in distinct microsporidian clades (Ironsides, 2007). Despite the lack of evidence for sexual reproduction in *N. ceranae*, its genome contains sex-related *loci* and genes related to the meiotic recombination machinery (Lee *et al.* 2010a, b) and a potential sexual haplo-diploid cycle of the parasite has been hypothesized (Sagastume *et al.* 2011). Only deep molecular studies of clonal cultured populations of *N. ceranae* could resolve its degree of ploidy, recombination and sexual/asexual cycle.

EnP1B and NCER_101600, which are the two markers showing numerous *indels* of repeated motifs (Fig. 4), were the most polymorphic markers (π),

with the highest isolate differentiation (F_{ST}), and showed more polymorphic site pairs with significant LD and higher R_m , i.e. more recombination events are required to explain the observed haplotype diversity (Table 2). These two genes seem to have experienced slightly independent evolutionary history that could be related to their potential involvement in pathogenesis. Indeed the *E. cuniculi* EnP1 contains repeated peptides related to heparin-binding motifs and is involved in the parasite adhesion to the host cell surface *in vitro* (Southern *et al.* 2007). Polymorphism is a common feature of genes involved in the gene-for-gene relationships between a parasite and its host. Some models have suggested that such polymorphism could be stabilized in parasite populations associated with polycyclic diseases (Tellier and Brown, 2007), i.e. when several parasite generations develop in a host through autoinfection, which is thought to be the case for microsporidia (Cali and Takvorian, 1999). NCER_101600 may well be involved in a gene-for-gene host-parasite interaction.

CONCLUSION

Taken as a phenotypic variation, differences in a parasite virulence would reflect a non-exclusive combination of its (1) genetic polymorphism *sensu stricto*, i.e. its genetically determined virulence strategies adapted to certain environmental conditions – including the host niche – and (2) polyphenism, i.e. the expression of alternative virulence strategies depending on environmental cues (Pfennig, 2001; Schwander and Leimar, 2011). The present work showed that despite a relatively high nucleotide diversity, a similar parasite population is found within geographically distant honeybee isolates. Thus the virulence of *N. ceranae* should rather be related to an alteration of the host-parasite interactions in response to environmental cues, including environmental stressors (Bromenshenk *et al.* 2010; Gisder *et al.* 2010) and the honeybee genetic background (Fontbonne *et al.* 2013), than to its polymorphism.

Lastly, if the present work showed that *N. ceranae* populations are poorly divergent in distant isolates, it questions the origin and maintenance of a strong haplotype diversity within a single honeybee host. Our data support the hypothesis of a recent host jump of *N. ceranae* from the Asian to the European honeybee that would be still followed by a population expansion – and possibly further radiation – in its new host niche, without clear isolation from the *A. ceranae*-infecting parasites. Altogether, these findings suggest that *N. ceranae* may constitute a valuable model to monitor the evolution of an emerging parasite.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to J. Vandamme, V. Chaimanee and P. Chantawannakul for providing us with infected honeybees.

FINANCIAL SUPPORT

This work was funded by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, EC2CO: Ecosphère continentale et côtière), a European grant for beekeeping (FEAGA-convention 10–31 R/2008–2010) and by the Région Auvergne (Programme Nouveau Chercheur). MR was supported by a grant from Région Auvergne and JA from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P. and Higes, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology* **11**, 2284–2290. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* **340**, 783–795.
- Beckel, J. J. and Andreadis, T. G. (1999). Microsporidia in insects. In *The Microsporidia and Microsporidiosis* (ed. Wittner, M. and Weiss, L. M.), pp. 447–501. ASM Press, Washington, DC, USA.
- Birky, C. W., Jr. (1996). Heterozygosity, heteromorphy, and phylogenetic trees in asexual eukaryotes. *Genetics* **144**, 427–437.
- Botias, C., Anderson, D. L., Meana, A., Garrido-Bailon, E., Martín-Hernández, R. and Higes, M. (2012). Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **110**, 108–113. doi: 10.1016/j.jip.2012.02.014.
- Bromenshenk, J. J., Henderson, C. B., Wick, C. H., Stanford, M. F., Zulich, A. W., Jabbour, R. E., Deshpande, S. V., McCubbin, P. E., Seccomb, R. A., Welch, P. M., Williams, T., Firth, D. R., Skowronski, E., Lehmann, M. M., Bilimoria, S. L., Gress, J., Wanner, K. W. and Cramer, R. A., Jr. (2010). Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS ONE* **5**, e13181. doi: 10.1371/journal.pone.0013181.
- Calì, A. and Takvorian, P. M. (1999). Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In *The Microsporidia and Microsporidiosis* (ed. Wittner, M. and Weiss, L. M.), pp. 85–128. ASM Press, Washington, DC, USA.
- Capella-Gutiérrez, S., Marcet-Houben, M. and Gabaldón, T. (2012). Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biology* **10**, 47. doi: 10.1186/1741-7007-10-47.
- Chaimanee, V., Warrit, N. and Chantawannakul, P. (2010). Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *Journal of Invertebrate Pathology* **105**, 207–210. doi: 10.1016/j.jip.2010.06.005.
- Chaimanee, V., Chen, Y., Pettis, J. S., Scott Cornman, R. and Chantawannakul, P. (2011). Phylogenetic analysis of *Nosema ceranae* isolated from European and Asian honeybees in Northern Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology* **107**, 229–233. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.012.
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J. D. and Pettis, J. S. (2012). Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology* **58**, 1090–1095. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.04.016.
- Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B. and Pettis, J. S. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**, 186–188. doi: 10.1016/j.jip.2007.07.010.
- Chen, Y., Evans, J. D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A. M. and Pettis, J. S. (2009a). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **101**, 204–209. doi: 10.1016/j.jip.2009.05.012.
- Chen, Y. P., Evans, J. D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D. and Pettis, J. S. (2009b). Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **56**, 142–147. doi: 10.1111/j.1550-7408.2008.00374.x.
- Cornman, R. S., Chen, Y. P., Schatz, M. C., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., Egholm, M., Hutchison, S., Pettis, J. S., Lipkin, W. I. and Evans, J. D. (2009). Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathogens* **5**, e1000466. doi: 10.1371/journal.ppat.1000466.
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P. L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D. M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A. L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S. K., Simons, J. F., Egholm, M., Pettis, J. S. and Lipkin, W. I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* **318**, 283–287. doi: 10.1126/science.1146498.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. and Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research* **14**, 1188–1190. doi: 10.1101/gr.849004.
- Didier, E. S., Vossbrinck, C. R., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C. and Shaddock, J. A. (1995). Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* **111**, 411–421. doi: 10.1017/S0031182000065914.
- Dussaubat, C., Brunet, J.-L., Higes, M., Colbourne, J. K., Lopez, J., Choi, J. H., Martín-Hernández, R., Botias, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L. P., Moritz, R. F., Le Conte, Y. and Alaux, C. (2012). Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE* **7**, e37017. doi: 10.1371/journal.pone.0037017.
- Fay, J. C. and Wu, C. I. (1999). A human population bottleneck can account for the discordance between patterns of mitochondrial versus nuclear DNA variation. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 1003–1005.
- Fontbonne, R., Garnery, L., Vidau, C., Aufauvre, J., Texier, C., Tchamitchian, S., El Alaoui, H., Brunet, J. L., Delbac, F. and Biron, D. G. (2013). Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection Genetics and Evolution* **17**, 188–194.
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S73–S79. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.017.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**, 915–925.
- Gatehouse, H. S. and Malone, L. A. (1998). The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *Journal of Invertebrate Pathology* **71**, 97–105. doi: 10.1006/jip.1997.4737.
- Gisder, S., Hedtke, K., Mockel, N., Frielitz, M. C., Linde, A. and Gensersch, E. (2010). Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 3032–3038. doi: 10.1128/AEM.03097-09.
- Haag, K. L., Traunecker, E. and Ebert, D. (2013). Single-nucleotide polymorphisms of two closely related microsporidian parasites suggest a clonal population expansion after the last glaciation. *Molecular Ecology* **22**, 314–326. doi: 10.1111/mec.12126.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98.
- Haro, M., Del Aguila, C., Fenoy, S. and Henriques-Gil, N. (2003). Intraspecific genotype variability of the microsporidian parasite *Encephalitozoon hellem*. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 4166–4171. doi: 10.1128/JCM.41.9.4166-4171.2003.
- Hatjina, F., Tsoktouridis, G., Bouga, M., Charistos, L., Evangelou, V., Avtzi, D., Meeus, I., Brunain, M., Smagghe, G. and de Graaf, D. C. (2011). Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *Journal of Invertebrate Pathology* **108**, 131–134. doi: 10.1016/j.jip.2011.07.003.
- Higes, M., Martín-Hernández, R. and Meana, A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* **41**, 375–392. doi: 10.1051/apido/2010019.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botias, C., Bailon, E. G., Gonzalez-Porto, A. V., Barrios, L., Del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jimenez, J. J., Palencia, P. G. and Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* **10**, 2659–2669. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botias, C. and Martín-Hernández, R. (2013). *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports* **5**, 17–29. doi: 10.1111/1758-2229.12024.
- Huang, W. F., Bocquet, M., Lee, K. C., Sung, I. H., Jiang, J. H., Chen, Y. W. and Wang, C. H. (2008). The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**, 9–13. doi: 10.1016/j.jip.2007.07.001.
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Campa, J., Katz, H., Gardiol, G. and Mendoza, Y. (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology* **101**, 150–153. doi: 10.1016/j.jip.2009.03.006.

- Ironsides, J.E. (2007). Multiple losses of sex within a single genus of Microsporidia. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 48. doi: 10.1186/1471-2148-7-48.
- Ironsides, J.E. (2013). Diversity and recombination of dispersed ribosomal DNA and protein coding genes in Microsporidia. *PLoS ONE* **8**, e55878. doi: 10.1371/journal.pone.0055878.
- Keeling, P.J. and Fast, N.M. (2002). Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology* **56**, 93–116. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160854.
- Klee, J., Besana, A.M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D.Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Ruz, J.M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I. and Paxton, R.J. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* **96**, 1–10. doi: 10.1016/j.jip.2007.02.014.
- Lee, S.C., Corradi, N., Doan, S., Dietrich, F.S., Keeling, P.J. and Heitman, J. (2010a). Evolution of the sex-related locus and genomic features shared in microsporidia and fungi. *PLoS ONE* **5**, e10539. doi: 10.1371/journal.pone.0010539.
- Lee, S.C., Ni, M., Li, W., Shertz, C. and Heitman, J. (2010b). The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**, 298–340. doi: 10.1128/MMBR.00005-10.
- Li, J., Chen, W., Wu, J., Peng, W., An, J., Schmid-Hempel, P. and Schmid-Hempel, R. (2012). Diversity of *Nosema* associated with bumblebees (*Bombus* spp.) from China. *International Journal for Parasitology* **42**, 49–61. doi: 10.1016/j.ijpara.2011.10.005.
- Librado, P. and Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451–1452. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187.
- Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailon, E. and Higes, M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 6331–6338. doi: 10.1128/AEM.00270-07.
- Martin-Hernandez, R., Botias, C., Barrios, L., Martinez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C. and Higes, M. (2011). Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research* **109**, 605–612. doi: 10.1007/s00436-011-2292-9.
- Martin-Hernandez, R., Botias, C., Bailon, E.G., Martinez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A. and Higes, M. (2012). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environmental Microbiology* **14**, 2127–2138. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x.
- Mathis, A., Tanner, I., Weber, R. and Deplazes, P. (1999). Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *International Journal for Parasitology* **29**, 767–770. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00025-9.
- Mutinelli, F. (2011). The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): overview and recent developments. *Revue Scientifique et Technique/Office international des épizooties* **30**, 257–271.
- Nei, M. and Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, NY, USA.
- O'Mahony, E.M., Tay, W.T. and Paxton, R.J. (2007). Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **54**, 103–109. doi: 10.1111/j.1550-7408.2006.00232.x.
- Paxton, R.J., Klee, J., Korpela, S. and Fries, I. (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* **38**, 558–565. doi: 10.1051/apido:2007037.
- Peuvel, I., Delbac, F., Metenier, G., Peyret, P. and Vivares, C.P. (2000). Polymorphism of the gene encoding a major polar tube protein PTP1 in two microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. *Parasitology* **121**, 581–587. doi: 10.1017/S0031182000006910.
- Peuvel-Fanget, I., Polonais, V., Brosson, D., Texier, C., Kuhn, L., Peyret, P., Vivarès, C. and Delbac, F. (2006). EnP1 and EnP2, two proteins associated with the *Encephalitozoon cuniculi* endospore, the chitin-rich inner layer of the microsporidian spore wall. *International Journal for Parasitology* **36**, 309–318. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.10.005.
- Pfennig, K.S. (2001). Evolution of pathogen virulence: the role of variation in host phenotype. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **268**, 755–760. doi: 10.1098/rspb.2000.1582.
- Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Lucía, M., Botias, C., Meana, A., Abrahamovich, A.H., Lange, C. and Higes, M. (2009). South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* **1**, 131–135. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00018.x.
- Polonais, V., Mazet, M., Wawrzyniak, I., Texier, C., Blot, N., El Alaoui, H. and Delbac, F. (2010). The human microsporidian *Encephalitozoon hellem* synthesizes two spore wall polymorphic proteins useful for epidemiological studies. *Infection and Immunity* **78**, 2221–2230. doi: 10.1128/IAI.01225-09.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. and Kunin, W.E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution* **25**, 345–353. doi: 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- Ramírez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., Calafell, F. and Navarro, A. (2008). Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics* **179**, 555–567. doi: 10.1534/genetics.107.083006.
- Ramos-Onsins, S.E. and Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* **19**, 2092–2100.
- Rozas, J. (2009). DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP. *Methods in Molecular Biology* **537**, 337–350. doi: 10.1007/978-1-59745-251-9_17.
- Rozas, J., Gullaud, M., Blandin, G. and Aguade, M. (2001). DNA variation at the *rp49* gene region of *Drosophila simulans*: evolutionary inferences from an unusual haplotype structure. *Genetics* **158**, 1147–1155.
- Sagastume, S., Del Aguila, C., Martín-Hernández, R., Higes, M. and Henriques-Gil, N. (2011). Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees. *Environmental Microbiology* **13**, 84–95. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02311.x.
- Schwander, T. and Leimar, O. (2011). Genes as leaders and followers in evolution. *Trends in Ecology and Evolution* **26**, 143–151. doi: 10.1016/j.tree.2010.12.010.
- Southern, T.R., Jolly, C.E., Lester, M.E. and Hayman, J.R. (2007). EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells *in vitro*. *Eukaryotic Cell* **6**, 1354–1362. doi: 10.1128/EC.00113-07.
- Tajima, F. (1989). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 597–601.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Tay, W.T., O'Mahony, E.M. and Paxton, R.J. (2005). Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **52**, 505–513. doi: 10.1111/j.1550-7408.2005.00057.x.
- Tellier, A. and Brown, J.K. (2007). Polymorphism in multilocus host parasite coevolutionary interactions. *Genetics* **177**, 1777–1790. doi: 10.1534/genetics.107.074393.
- ten Hove, R.J., Van Lieshout, L., Beadsworth, M.B., Perez, M.A., Spee, K., Claas, E.C. and Verweij, J.J. (2009). Characterization of genotypes of *Enterocytozoon bienersi* in immunosuppressed and immunocompetent patient groups. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **56**, 388–393. doi: 10.1111/j.1550-7408.2009.00393.x.
- Visvesvara, G.S., da Silva, A.J., Croppo, G.P., Pieniazek, N.J., Leitch, G.J., Ferguson, D., de Moura, H., Wallace, S., Slemenda, S.B. and Tyrrell, I. (1995). *In vitro* culture and serologic and molecular identification of *Septata intestinalis* isolated from urine of a patient with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 930–936.
- Vizoso, D.B. and Ebert, D. (2005). Mixed inoculations of a microsporidian parasite with horizontal and vertical infections. *Oecologia* **143**, 157–166. doi: 10.1007/s00442-004-1771-4.
- Wu, Z., Li, Y., Pan, G., Tan, X., Hu, J., Zhou, Z. and Xiang, Z. (2008). Proteomic analysis of spore wall proteins and identification of two spore wall proteins from *Nosema bombycis* (Microsporidia). *Proteomics* **8**, 2447–2461. doi: 10.1002/pmic.200700584.
- Wu, Z., Li, Y., Pan, G., Zhou, Z. and Xiang, Z. (2009). SWP25, a novel protein associated with the *Nosema bombycis* endospore. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **56**, 113–118. doi: 10.1111/j.1550-7408.2008.00375.x.
- Zander, E. (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Leipziger Bienenzeitung* **24**, 147–150.
- Zheng, D., Alm, E.W., Stahl, D.A. and Raskin, L. (1996). Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4504–4513.